

**Untersuchungen zum Spleißmechanismus von mRNA-Vorläufern in
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: Einfluß der Exon-Sequenzen und
Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Transkription.**

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Angela Löw-Stadlmüller
am
25. 5. 1988



**Untersuchungen zum Spleißmechanismus von mRNA-Vorläufern in
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: Einfluß der Exon-Sequenzen und
Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Transkription.**

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Angela Löw-Stadlmüller

am

25. 5. 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1988

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1984 bis Januar 1988 am Laboratorium für molekulare Biologie - Genzentrum der Universität München - auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. H. Domdey durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, am Münchner Genzentrum arbeiten zu können, und für sein unermüdliches Bestreben, optimale Arbeitsbedingungen für die Mitarbeiter an diesem neu geschaffenen Institut zu gewährleisten.

Herrn Dr. H. Domdey gilt mein besonderer Dank: Nicht nur sein stets engagiertes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das sich in vielen Gesprächen und Diskussionen offenbarte, sondern auch seine ausgleichende Art, die zu einem hervorragenden Arbeitsklima beitrug, waren mir eine große Hilfe.

Allen Kolleginnen und Kollegen, die in irgendeiner Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben - allen voran Frau A. Schweizer, Frau K. Vogel und Herrn Dr. M. Duchène - möchte ich an dieser Stelle dafür danken, daß sie mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Es war nicht nur interessant, sondern es hat auch Freude gemacht, mit ihnen zusammen zuarbeiten.

Meinem Mann, Jörg Stadlmüller, möchte ich an dieser Stelle nicht nur dafür danken, daß er meine Arbeit mit großer Gründlichkeit auf Fehler durchgesehen hat, sondern auch dafür, daß er in jeder Hinsicht Verständnis aufbrachte und viel Geduld, die ich besonders in letzter Zeit stark strapazieren mußte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
11	Abkürzungen	1
12	Einleitung des Verfassers	1
2	Ergebnisse	10
21	Ergebnisse der Untersuchungen	10
211	Ergebnisse der Untersuchungen	10
212	Ergebnisse der Untersuchungen	10
213	Ergebnisse der Untersuchungen	10
214	Ergebnisse der Untersuchungen	10
215	Ergebnisse der Untersuchungen	10
216	Ergebnisse der Untersuchungen	10
217	Ergebnisse der Untersuchungen	10
218	Ergebnisse der Untersuchungen	10
219	Ergebnisse der Untersuchungen	10
22	Ergebnisse der Untersuchungen	10
221	Ergebnisse der Untersuchungen	10
222	Ergebnisse der Untersuchungen	10
223	Ergebnisse der Untersuchungen	10
224	Ergebnisse der Untersuchungen	10
225	Ergebnisse der Untersuchungen	10
226	Ergebnisse der Untersuchungen	10
227	Ergebnisse der Untersuchungen	10
228	Ergebnisse der Untersuchungen	10
229	Ergebnisse der Untersuchungen	10
23	Ergebnisse der Untersuchungen	10
231	Ergebnisse der Untersuchungen	10
232	Ergebnisse der Untersuchungen	10

für meine Mutter
 und
 im Gedenken
 an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Allgemeine Einführung	S. 1
1.2.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	S. 8
2.	Ergebnisse	S. 10
2.1.	<u>Entwicklung und Charakterisierung eines zellfreien</u> <u><i>In vitro</i>- Hefe-Spleißsystem</u>	S. 10
2.1.1.	Herstellung von SP6-Transkripten	S. 11
2.1.2.	Herstellung eines Hefe-Spleißextrakts	S. 12
2.1.3.	Durchführung und Analyse der <i>In vitro</i> - Spleißreaktion	S. 13
2.1.3.1.	Analyse der Spleißreaktionen durch Polyacrylamid- Gelelektrophorese	S. 13
2.1.3.2.	Analyse von Spleißkomplexen	S. 15
2.1.4.	Analyse der <i>In vitro</i> -Spleißbedingungen	S. 19
2.1.4.1.	Zeitabhängigkeit	S. 19
2.1.4.2.	Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches	S. 20
2.2.	<u>Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Länge der</u> <u>Exons</u>	S. 24
2.2.1.	Exon-Verkürzungen durch RNase H-Verdau	S. 24
2.2.2.	Verkürzung des ersten Exons durch gezielte Mutagenese <i>in vitro</i>	S. 27
2.2.2.1.	Herstellung der Exon 1-Mutanten	S. 28
2.2.2.2.	Analyse der Spleißreaktionen	S. 30
2.2.2.3.	Analyse von Spleißkomplexen	S. 33
2.2.3.	Effekt einer Verkürzung des zweiten Exons auf das Spleißverhalten von Transkripten mit bereits ver- kürztem Exon 1	S. 35
2.3.	<u>Auswirkung der Struktur des 5'-Endes einer Prä- mRNA auf die Spleißreaktion</u>	S. 39
2.3.1.	Untersuchungen am Standardtranskript von SPact64	S. 40
2.3.2.	Untersuchungen an Exon 1-Mutanten	S. 43

2.4.	<u>Untersuchungen zum Einfluß der Transkription auf Spleißen und Polyadenylierung und zur gegenseitigen Beeinflussung von Prä-mRNA-Prozessierungsschritten</u>	S. 44
2.4.1.	Herstellung der Konstrukte	S. 45
2.4.2.	Analyse der <i>In vivo</i> -Spleißreaktion und -Spleißeffizienz der Actin-Konstrukte	S. 56
2.4.3.	Analyse der <i>In vivo</i> -Spleißreaktion und -Spleißeffizienz des MAT a1-Konstrukts	S. 64
3.	Diskussion	S. 67
3.1	Präparation von Spleißextrakten aus Hefezellen im Vergleich zu denen aus höheren Eukaryonten	S. 67
3.2.	Charakterisierung der <i>In vitro</i> -Spleißreaktion in Hefe	S. 69
3.3	Bedeutung der Exon-Längen für die Spleißreaktion	S. 70
3.4.	Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Struktur des 5'-Endes der Prä-mRNA	S. 73
3.5.	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zum Zusammenspiel von Transkription und mRNA-Prozessierungsschritten	S. 73
4.	Material und Methoden	S. 80
4.1.	<u>Material</u>	S. 80
4.1.1.	Reagentien und ihre Bezugsquellen	S. 80
4.1.2.	Geräte und Zubehör	S. 83
4.1.3.	Kulturmedien	S. 85
4.1.4.	Allgemeine Puffer	S. 88
4.1.5.	Vektoren	S. 88
4.1.6.	Bakterienstämme	S. 88
4.1.7.	Hefestämme	S. 88
4.2.	<u>Methoden</u>	S. 89
4.2.1.	Allgemeine Methoden	S. 89
4.2.1.1.	Fällung von DNA und RNA mit Ethanol	S. 89
4.2.1.2.	Phenolextraktion	S. 89
4.2.1.3.	Elektrophoretische Methoden	S. 90
4.2.1.4.	Identifizierung von Banden auf Gelen und Filtern	S. 94
4.2.1.5.	Reinigen von Oligodeoxynukleotiden	S. 95

III

4.2.1.6.	Anzucht von Bakterien, Phagen, Hefen	S. 96
4.2.2.	Restriktionsspaltungen	S. 97
4.2.3.	Radioaktive Markierung von Hybridisierungsproben	S. 99
4.2.3.1.	Nick-Translation von Plasmiden	S. 99
4.2.3.2.	Modifizierte Nick-Translation von DNA-Fragmenten	S. 100
4.2.3.4.	5'-Markierung von Oligodeoxynukleotiden	S. 100
4.2.3.5.	Herstellen eines radioaktiv markierten DNA- Längen- markers	S. 101
4.2.4.	Klonierungen	S. 102
4.2.4.1.	Spaltung von Vektoren und Bereitstellung von Fragmenten	S. 103
4.2.4.2.	Fragmentisolierung	S. 104
4.2.4.3.	Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren durch Ligation	S. 105
4.2.4.4.	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	S. 106
4.2.4.5.	Transformation von E. coli-Bakterien mit Phagen-DNA	S. 108
4.2.5.	Identifizierung von positiven Transformanden ("Screening")	S. 109
4.2.5.1.	IPTG/X-Gal-System	S. 110
4.2.5.2.	Koloniehybridisierung	S. 110
4.2.5.3.	Mini-Plasmid-Präparationen	S. 110
4.2.5.4.	Dot Blot	S. 112
4.2.5.5.	Southern Blot	S. 112
4.2.5.6.	Plaque-Hybridisierung	S. 112
4.2.5.7.	Identifizierung von positiven Hefe-Transformanden	S. 113
4.2.6.	DNA-Isolierungsmethoden im präparativen Maßstab	S. 113
4.2.6.1.	Präparation von Plasmiden und doppelsträngiger M13-Phagen-DNA aus E.coli durch alkalische Lyse mit anschließender CsCl-Gradientenzentrifugation	S. 113
4.2.6.2.	Isolierung einzelsträngiger M13-Phagen-DNA	S. 114
4.2.6.3.	Isolierung von Hefe-DNA	S. 115
4.2.7.	Isolierung von RNA aus Hefe	S. 116
4.2.7.1.	Isolierung von Gesamt-RNA	S. 116
4.2.7.2.	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA	S. 116
4.2.8.	Transfer von DNA oder RNA aus Gelen auf Nitro- zellulose-Filter	S. 117
4.2.8.1.	Southern Blot	S. 117
4.2.8.2.	Northern Blot	S. 118



IV

4.2.9.	Filter-Hybridisierungs-Methoden	S. 119
4.2.9.1.	Hybridisierung mit nick-translatierten Plasmiden oder DNA-Fragmenten	S. 119
4.2.9.2.	Hybridisierung mit endmarkierten Oligodeoxynukleotiden	S. 120
4.2.10.	DNA-Sequenzierung	S. 121
4.2.11.	Gerichtete M13-Einzelstrang-Mutagenese	S. 124
4.2.12.	<i>In vitro</i> -Transkription mit dem SP6-Transkriptionssystem	S. 125
4.2.12.1.	Standard-Vorschrift	S. 126
4.2.12.2.	Dinukleotid-Priming	S. 128
4.2.12.3.	Modifikationen am fertigen Transkript	S. 129
4.2.13.	Hefe-Spleißextrakt	S. 130
4.2.14.	<i>In vitro</i> -Hefe-Spleißreaktion	S. 131
4.2.15.	Nachweis von Spleißreaktions-Intermediaten und -Produkten	S. 132
4.2.15.1.	Denaturierende Gel-Elektrophorese	S. 132
4.2.15.2.	Reverse Transkription = "Primer Extension"	S. 133
4.2.16.	Nachweis von Spleiß-Komplexen	S. 136
4.2.16.1.	Glycerin-Gradienten	S. 136
4.2.16.2.	Native Gele ("Composite Gels")	S. 137
5.	Zusammenfassung	S. 138
6.	Literatur	S. 140

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen = "calf intestine alkaline phosphatase"
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute (Cerenkov) = "counts per minute"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LMA	Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt = "Low melting agarose"
min	Minute
N	Nukleosid
NTS	Nicht-transkribierter "Spacer"
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
TAP	Pyrophosphatase aus Tabak = "Tobacco Acid Pyrophosphatase"
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Nach Aufklärung der Struktur der DNA durch *Watson und Crick* 1953 galt die Aufmerksamkeit der Molekularbiologen dem Problem der Umsetzung von genetischer Information in zelluläre Komponenten. *Ingram* konnte 1957 zeigen, daß viele Gene offensichtlich den Bauplan für Proteine besitzen und *Crick* stellte 1958 das "zentrale Dogma" auf: Von DNA, doppelsträngiger Deoxyribonukleinsäure, wird mRNA, einzelsträngige Boten-Ribonukleinsäure, abgeschrieben oder transkribiert. Die mRNA wiederum dirigiert die Synthese von Protein, ihre Struktur wird in eine Protein-Struktur übersetzt oder translatiert. Translation und Transkription galten als Einbahn-Straßen und nicht umkehrbar, was für die Transkription seit der Entdeckung der Reversen Transkriptase aus Retroviren (*Temin und Mizutani*, 1970; *Baltimore*, 1970) relativiert werden muß. 1964 stellten *Yanofsky et al.* das Prinzip der Kolinearität auf, wonach sich die Basenabfolge in einem Gen in der Aminosäuresequenz eines Proteins kolinear widerspiegelt. Schließlich wurde der genetische Code aufgeklärt (*Khorana*, 1968; *Nirenberg*, 1968), bei dem jeweils ein Basen-Triplett für eine Aminosäure kodiert, wobei es für eine Aminosäure allerdings oft mehrere Triplets gibt (degenerierter Code). Dieser Code gilt als beinahe universell (Ausnahme: Mitochondriales Genom von Säugern und Hefe).

All die oben erwähnten Ergebnisse wurden anhand von Untersuchungen an Prokaryonten, meist Eubakterien, gewonnen. Erst allmählich ging man auch daran, die Verhältnisse bei Eukaryonten zu erforschen. Eukaryonten unterscheiden sich von Prokaryonten v. a. durch den Besitz eines Zellkerns, in dem u. a. die Chromosomen durch eine Doppelmembran von der übrigen Zelle abgetrennt sind. Ausserdem enthalten sie eine Reihe von weiteren Zellstrukturen, die es in Bakterien nicht gibt: Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien, Chloroplasten (in Pflanzen), Lysosomen. Durch ihre viel komplexere Organisation waren sie natürlich auch den verschiedenen Untersuchungsmethoden, die ursprünglich an den einfacher gebauten Bakterien entwickelt wurden, schwieriger zugänglich. Es war aber von großem Interesse, zu erfahren, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede sich z. B. bei der Genexpression zeigen würden. 1977 machten dabei mehrere Arbeitsgruppen eine erstaunliche Entdeckung: Das oben erwähnte Prinzip der Kolinearität konnte bei Eukaryonten in seiner ursprünglichen Form nicht aufrecht erhalten werden. Untersuchungen an mRNAs aus menschlichen Zellen, die

mit Adenoviren infiziert waren, zeigten auf, daß verschiedene mRNAs aus dem späteren Infektionsstadium alle das gleiche 5'-Ende besaßen, ansonsten aber unterschiedlichen Bereichen des Virusgenoms entsprachen. Durch Hybridisierung der mRNAs an die DNA konnte direkt unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden, daß dabei zwar bestimmte Abschnitte der DNA mit der RNA Doppelstränge ausbilden konnten, andere dagegen nicht, die deshalb als Schleifen vom Doppelstrang ausstülpten (*Berget et al.*, 1977; *Chow et al.*, 1977). Diese Ergebnisse waren nicht auf Gene eukaryontischer Viren beschränkt, sondern konnten auch für zelleigene Gene bestätigt werden, so z. B. für das Hühner-Ovalbumin-Gen (*Breathnach et al.*, 1977), ein Immunglobulingen (*Brack und Tonegawa*, 1977) und die beta-Globin-Gene aus Kaninchen und Maus (*Jeffreys und Flavell*, 1977, *Tilghman et al.*, 1978). Offensichtlich blieben bestimmte Genbereiche auf dem Weg von DNA zu mRNA nicht erhalten. Anfangs war allerdings nicht klar, ob sie überhaupt nicht abgeschrieben wurden (diskontinuierliche Transkription) oder ob sie nach dem Abschreiben herausgeschnitten wurden. Durch Synthese von cDNAs, also reversen DNA-Transkripten von den fraglichen mRNAs, z. B. für Ovalbumin (*Lai et al.*, 1978), und Vergleich mit den genomischen DNA-Bereichen konnten schließlich exakt die transkribierten Genabschnitte, die auch in der entsprechenden mRNA zu finden sind, und solche, die dort nicht mehr vorliegen, bestimmt werden. Erstere wurden als Exons, zweite als Introns oder intervenierende Sequenzen bezeichnet. Exons umfassen nicht nur protein-kodierende Bereiche von Genen, sondern auch nicht-translatierte Bereiche an den 5'- und 3'-Enden der Gene (sog. Leader- und Trailer-Sequenzen).

Tatsächlich gibt es Introns auch in Genen, die für ribosomale RNAs (rRNAs) oder Transfer-RNAs (tRNAs) kodieren, also nicht für Proteine. Diese sollen hier aber nicht interessieren.

Um die Frage, wie Introns entfernt werden, zu klären, wandte man sich einer Gruppe von RNAs zu, die man im Kern gefunden hatte und die verschiedene Eigenschaften mit mRNAs gemeinsam hatten wie 5'-cap und 3'-poly(A)-Schwanz: Die sog. hnRNAs (hn = heterogeneous nuclear) sind sehr heterogen in Länge und Zusammensetzung und im Durchschnitt 10 x länger als mRNAs (*Darnell*, 1976). Zunächst konnte man ihnen keine Funktion zuordnen. Mit der Entdeckung der Exon-Intron-Organisation vieler Gene aber lag die Vermutung nahe, daß sie Primärtranskripte darstellten, also Vorläufer-mRNAs, aus denen die Introns erst entfernt werden müssten. Dies konnte durch Hybridisierungsexperimente bewiesen werden (*Tilghman et al.*, 1978; *Roop et al.*, 1978), und damit stand fest, daß es sich hierbei um einen weiteren RNA-Prozessierungsschritt bei Eukaryonten handelt: Er wird als RNA-Spleißen bezeichnet, worunter Herausschneiden des Introns und Zusammenfügen der Exons verstanden wird.

In den letzten Jahren sind die Mechanismen des RNA-Spleißvorgangs genau untersucht worden. Sie können, was das Substrat angeht, in drei Gruppen eingeteilt werden: Beim Spleißen von tRNA-Vorläufermolekülen (besitzen sehr kurze Introns) sind Sekundärstrukturen der Exonbereiche von großer Bedeutung, bei rRNA-Vorläufern und RNAs aus Mitochondrien und Chloroplasten dagegen ausgeprägte Sekundärstrukturen der oft sehr langen Introns. Im Gegensatz dazu spielen Sekundärstrukturen bei Prä-mRNAs offenbar nur eine untergeordnete Rolle. Hier sind es v. a. konservierte Sequenzbereiche an den Exon-Intron-Grenzen oder nahe davon, die wichtig sind (*Cech, 1983*).

Beim Vergleich von Sequenzen an den Exon-Intron-Übergängen verschiedener mRNA-Vorläufer fiel auf, daß Introns fast immer mit GT beginnen und mit AG enden (*Mount, 1982*), was zur Aufstellung der GT-AG-Regel führte, obwohl sogar etwas längere Consensus-Sequenzen gefunden wurden. So gibt es für die 5'-Spleißstelle von Introns einen Consensus von Nukleotiden, mit dem die meisten Introns in sieben Positionen übereinstimmen: (C/A)AG-GT(A/G)AGT. Die 3'-Spleißstelle dagegen wird definiert durch eine pyrimidinreiche Region (bei höheren Eukaryonten), in der nie die Basenfolge AG vorkommt, gefolgt von einem kurzen Consensus, der nur drei Nukleotide des Introns inklusive AG und ein Nukleotid des angrenzenden Exons umfaßt: (T/C)_nN(C/T)AG-G (*Breathnach und Chambon, 1981; Padgett et al., 1986*).

Introngrenzen aller Eukaryonten, von Hefen bis zum Menschen, entsprechen diesen beiden Consensus-Sequenzen. Bei Hefe aber ist erstens die 5'-Spleißstelle mit der Sequenz GTATGT hochkonserviert und zweitens gibt es noch eine zusätzliche Sequenz-Voraussetzung, die unbedingt erfüllt werden muß, nämlich die sog. Gallwitz-Box TACTAAC (*Langford und Gallwitz, 1983; Gallwitz et al., 1987*), die in allen Hefe-Introns nahe dem 3'-Ende vorkommt, nämlich 20 (MAT a1) bis 150 Nukleotide (*Astell et al., 1981; Schatz et al., 1986*) 5' von der 3'-Spleißstelle entfernt.

Der Spleißmechanismus wurde zunächst an Prä-mRNAs von höheren Eukaryonten einer Klärung näher gebracht (*Ruskin et al., 1984*). Wie sich dabei herausstellte, läuft die Reaktion in zwei Schritten ab: Zunächst wird an der 5'-Spleißstelle das erste Exon vom Intron abgetrennt, wobei das 5'-Ende des Introns die Phosphatgruppe aus der vorherigen Bindung behält und damit eine ungewöhnliche 2',5'-Phosphodiesterbindung mit einem Adenosin aus dem hinteren Bereich des Introns eingeht. Es entsteht also eine verzweigte Form der RNA, eine sog. Lasso-Struktur. Das abgeschnittene Exon trägt folgerichtig am 3'-Ende eine OH-Gruppe. Zwischenprodukte nach dem ersten Schritt der Reaktion sind

also ein freies Exon 1 und ein 2/3-Molekül aus Intron und anschließendem Exon, das die oben erwähnte Lassostruktur besitzt. Im zweiten Schritt nun gehen Exon 1 und Exon 2 eine Phosphodiesterbindung unter gleichzeitiger Abspaltung des Introns ein, das seine verzweigte Form behält. Die Phosphatgruppe aus der 3'-Spaltstelle zwischen Intron und Exon 2 findet sich nun in der neugebildeten Bindung zwischen den beiden Exons. Endprodukte der Reaktion sind also reife mRNA und herausgeschnittenes Intron in Lassoform (Abb. 1, nach Brody und Abelson, 1985).

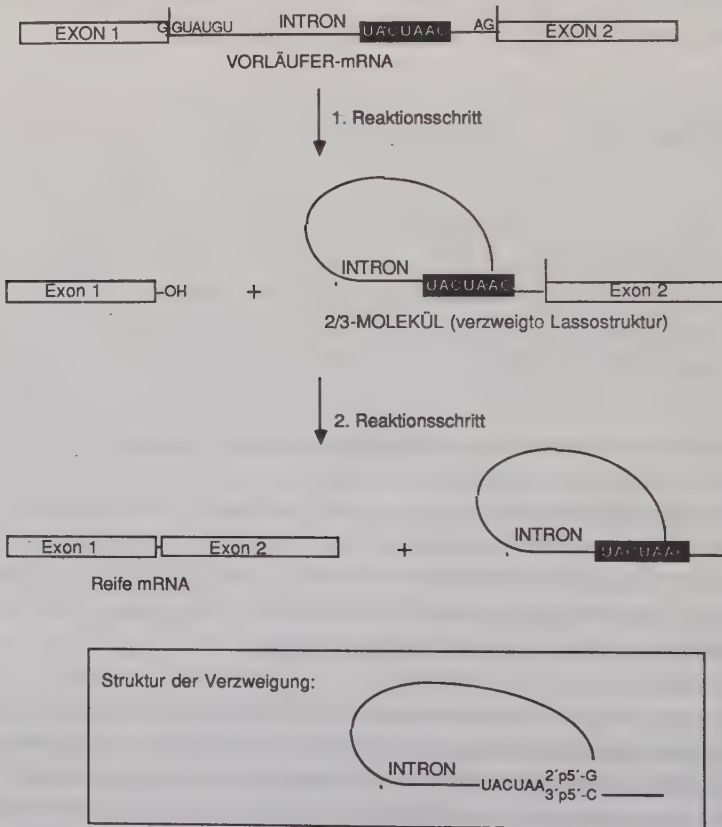


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prä-mRNA-Spleißmechanismus in Hefe. Die Sequenzen an der 5'-Spleißstelle und der 3'-Spleißstelle, sowie die der Gallwitz-Box (UACUAAC, schwarzer Balken) sind angegeben. Exon-Bereiche: weiße Balken; Intron: schwarze Linie. Im unteren Bereich ist die Struktur der Verzweigung dargestellt.

Während bei höheren Eukaryonten die Verzweigungsstelle im Intron nicht so streng definiert ist, ist sie bei Hefe genau festgelegt und zwar befindet sie sich dort immer am letzten Adenosin der hochkonservierten Gallwitz-Box, die auf RNA-Ebene die Sequenz UACUAAC besitzt.

Ein Parameter, der bis vor kurzem nur wenig untersucht worden war, ist die notwendige Mindestlänge von Exons und Introns, um noch korrektes Spleißen eines mRNA-Vorläufers zu ermöglichen. Für Introns in Hefe gibt es offensichtlich nicht nur eine Gesamt-Mindestlänge von ca. 52 Nukleotiden (das MATa1-Gen besitzt die kleinsten Introns mit 54 und 52 Nukleotiden Länge), sondern auch eine Minstdistanz zwischen 5'-Spleißstelle und Verzweigungsstelle, also UACUAAC-Box, die eingehalten werden muß (*Thompson-Jaeger und Domdey*, 1987). Wenn die Länge des zweiten Exons bei beta-Globin-Transkripten (Säugersystem) unter 20 Nukleotide kommt, wird die Spleißeffizienz stark herabgesetzt, bei 5 Nukleotiden ist sie völlig erloschen. Der erste Schritt der Prozessierung (Schnitt an der 5'-Spleißstelle und Ausbildung der Verzweigung) kann aber noch stattfinden (*Furdon und Kole*, 1986; *Parent et al.*, 1987). Bei einem Hefe-Primärtranskript kann die Länge des zweiten Exons bis auf 10 Nukleotide herabgesetzt werden, ohne die Spleißeffizienz zu beeinträchtigen. Der erste Schritt der Reaktion kann hier sogar noch beobachtet werden, wenn die 3'-Spleißstelle zwischen Intron und zweiten Exon völlig verschwunden ist und das Transkript kurz nach der UACUAAC-Box endet (*Rymond und Rosbash*, 1985). Beim ersten Exon des beta-Globin-Transkripts vom Kaninchen sind 24 Nukleotide ausreichend, um Spleißen zu ermöglichen (*Parent et al.*, 1987).

In letzter Zeit kam es zu einigen Fortschritten bei der Aufklärung der am Spleißen beteiligten zellulären Komponenten. Es steht fest, daß einige kleine, im Kern befindliche RNAs, die snRNAs, benötigt werden. Diese zeichnen sich durch eine besondere, dreifach methylierte ($m_3^{2,2,7}G$)-cap-Struktur an ihrem 5'-Ende und zumindest bei höheren Eukaryonten durch ihre Kürze (100 bis 215 Nukleotide) aus. Sie kommen nur als stabile Komplexe mit bestimmten Kern-Proteinen (snRNPs) vor, die wiederum ein gemeinsames Antigen besitzen, das vom anti-Sm-Antikörper erkannt wird, der von Patienten mit der Autoimmunkrankheit Lupus erythematosus gebildet wird.

Spleißen eines mRNA-Vorläufers kann nur erfolgen, wenn zuvor ein sog. Spleißkomplex mit diesem Vorläufer ausgebildet wurde (*Brody und Abelson*, 1985; *Grabowski et al.*, 1985): Dieser Komplex besteht aus einer Vielzahl und Vielfalt von Komponenten und kann wegen seiner Zusammensetzung (Proteine und verschiedene RNAs) am ehesten mit einem

Ribosom verglichen werden (engl. "Spliceosome"). Er enthält u. a. das hnProtein C (*Choi et al.*, 1986) und einige snRNPs mit ihren snRNAs: U2, U5, und zusätzlich U4/U6, die den einzigen Fall darstellen, wo sich zwei snRNAs in einem snRNP-Partikel befinden. Für alle konnte Beteiligung am Spleißen experimentell nachgewiesen werden (*Grabowski und Sharp*, 1986). U1-snRNA bindet offensichtlich nur am Anfang der Reaktion und ist später im Komplex nicht mehr auffindbar (*Bindereif und Green*, 1987). Ausbildung von Spleißkomplexen kann durch Dichtegradienten-Zentrifugation von *in vitro*-Spleißansätzen (radioaktiv markiertes Primär-Transkript inkubiert in Spleißextrakten) beobachtet werden, wobei in Hefe Vorläufer und Intermediate der Reaktion mit einem Komplex von 40 S (höhere Eukaryonten: 60 S) kosedimentieren (*Brody und Abelson*, 1985). Bei einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese von Spleißansätzen wird Transkript, das von einem Komplex gebunden wird, von diesem zurückgehalten und langsamer durch das Gel wandern können als ungebundenes. Mit solchen Experimenten ("gel retardation") konnte gezeigt werden, daß Spleißkomplexe in mehreren Formen vorliegen, von denen einige wahrscheinlich Vorstufen von anderen darstellen (*Lamond et al.*, 1987, *Pikielny et al.*, 1986).

Durch Analyse von Hefe-Spleißkomplexen konnte auch dort die Beteiligung von snRNPs am Spleißen nachgewiesen werden (*Pikielny und Rosbash*, 1986). Da diese snRNPs in Hefe viel seltener vorkommen als in höheren Eukaryonten, nämlich mit 10 bis 500 Kopien pro Zelle (*Wise et al.*, 1983), und auch nicht durch den anti-Sm-Antikörper erkannt werden (*Lerner et al.*, 1980), konnte ihnen erst spät eine spezielle Funktion zugeschrieben werden. Besonders interessant ist die snRNA snR20 (oder LSR1="large spliceosomal RNA 1"), die über 1000 Nukleotide lang ist (*Pikielny et al.*, 1986, *Riedel et al.*, 1986) und Homologien zu verschiedenen snRNAs aus höheren Eukaryonten, nämlich U2, U4, U5, U6, aufweist, allerdings nur zu U2 in einem größeren Bereich. Auch andere snRNAs wurden in Hefe-Spleißkomplexen gefunden: snR7S, snR7L und snR14. Diese Hefe snRNAs besitzen alle die typische $m_3^{2,2,7}$ G-cap-Struktur und wurden u. a. durch Einsetzen von Antikörpern (*Reuter et al.*, 1984) gegen dieses Trimethyl-cap identifiziert (*Cheng und Abelson*, 1986).

Wie im vorigen ausgeführt, stellt das Herausschneiden des Introns und gleichzeitige Verknüpfen der Exons einen weiteren Prozessierungsschritt dar, den alle Prä-mRNAs mit Introns durchlaufen müssen, bevor sie vom Kern ins Cytoplasma gelangen. Die beiden anderen mRNA-Prozessierungsschritte - das Anfügen eines m^7 G-caps am 5'-Ende und einer poly(A)-Sequenz am 3'-Ende - gehen, zumindest *in vivo*, dem Spleißen voraus. Bei ersterem reagiert ein GTP so mit der Triphosphatgruppe des ersten Nukleotids einer

naszierenden Prä-mRNA, daß eine ungewöhnliche 3'-G-5'-ppp-5'-N-3'-p-Struktur, kurz "cap" (=Kappe) genannt, entsteht. Diese wird dann noch an der 7. Position des Purin-Rings vom ersten Guanin methyliert (*Furuichi et al.*, 1975). Der Poly(A)-Schwanz wird vom Enzym Poly(A)-Polymerase an das 3'-Ende des Transkripts angehängt. Bei höheren Eukaryonten transkribiert RNA-Polymerase II meist weit über das 3'-Ende der reifen mRNA hinaus; es folgt dann ein Schnitt an der Polyadenylierungsstelle, der häufig die Sequenz AAUAAA (10 bis 25 Nukleotide 5' davon) vorausgeht, die allerdings nicht das einzige Polyadenylierungssignal darstellen kann. Bei Hefe ist nicht klar, ob ebenfalls geschnitten oder an der Poly(A)-Stelle terminiert wird. In beiden Fällen wird eine längere Folge von Adenin-Nukleotiden an das Transkript anpolymerisiert, ohne Sequenzvorlage im Gen. Die Länge des Poly(A)-Schwanzes beträgt bei höheren Eukaryonten bis zu 200 Nukleotide, bei Hefe weniger.

Vieles spricht dafür, daß die Polyadenylierung keine Voraussetzung für korrektes Spleißen ist (*Keohavong et al.*, 1982; *Zeevi et al.*, 1981). Beim "capping" allerdings liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: Einige sprechen dafür, daß ein nicht-5'-prozessierter mRNA-Vorläufer ein wesentlich schlechteres Substrat für die Spleiß-Maschinerie ist und daß sich andererseits *in vitro* die Spleiß-Aktivität vollkommen durch Zugabe eines cap-Analogs im Überschuß hemmen läßt; dies gilt sowohl für Kern- als auch für Gesamt-Extrakte aus HeLa-Zellen (*Ederly und Sonenberg*, 1985; *Konarska et al.*, 1984). Andere Ergebnisse sprechen gegen eine solche Abhängigkeit des Spleiß-Prozesses von der Struktur des 5'-Endes einer Vorläufer-mRNA (*Krainer et al.*, 1984; *Noble et al.*, 1986). Alle diese Resultate stammen von Untersuchungen an höheren Eukaryonten.

Ebenso interessiert, ob es eine Rolle für die anschließenden Prozessierungsschritte spielt, welche RNA-Polymerase die Transkription durchführt. Bekanntlich gibt es in Eukaryonten drei RNA-Polymerasen, von denen RNA-Polymerase II für die Synthese von primären, protein-kodierenden Transkripten, also Prä-mRNAs zuständig ist. RNA-Polymerase I transkribiert ausschließlich die ribosomale Vorläufer-RNA, während Polymerase III die 5S-rRNA und tRNAs abliest. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, die zeigen, daß die Transkription einer Prä-mRNA auch von einer anderen Polymerase als Polymerase II vorgenommen werden kann (z. B. *Grunmt und Skinner*, 1985). Darüber, ob an einem solchen Transkript noch Prozessierungsschritte durchgeführt werden, ob diese also polymerase-abhängig sind oder nicht, gehen die Meinungen auseinander. In einem Fall kann eine Vorläufer-mRNA, die von Polymerase III transkribiert wird, korrekt polyadenyliert werden (*Lewis und Manley*, 1986), in einem anderen Fall sind sowohl Polyadenylierung als auch Spleißen eines solchen Transkripts unterbunden (*Sisodia et al.*,

1987). Für polymerase I-abhängige Transkription einer Prä-mRNA gibt es noch keine Hinweise über die Auswirkung auf die Spleiß-Effizienz. Allerdings sind solche Transkripte, die nachweislich an der ribosomalen Transkriptions-Startstelle beginnen, nur schlechte Substrate für die Translation in menschlichen Zellen (Grummt und Skinner, 1985). Das könnte damit zusammenhängen, daß diese kein cap am 5'-Ende tragen, wie es für die von Polymerase I normalerweise gebildeten 37S-rRNAs der Fall ist (Klootwijk *et al.*, 1979; Nikolaev *et al.* 1979). Das wird durch Untersuchungen untermauert, die zeigen, daß die "capping"-Aktivität mit der Transkription durch Polymerase II gekoppelt ist, was für eine Assoziation der dafür benötigten Enzyme spräche (Furuiche, 1978; Jove und Manley, 1982).

1.2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

Bei der vorliegenden Arbeit wurde versucht, anhand des Hefesystems folgende Fragen zur Prozessierung von Prä-mRNAs zu klären:

- 1) Gibt es eine Mindestlänge der ein Intron umgebenden Exons in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die nicht unterschritten werden darf, damit beide Schritte der Spleiß-Reaktion stattfinden können?
- 2) Müssen Hefe-Primärtranskripte eine 5'-cap-Struktur tragen, um effizient und richtig gespleißt zu werden?
- 3) Sind Polyadenylierung und Spleißen mit der vorausgehenden Transkription durch RNA-Polymerase II gekoppelt?

Um zelluläre Vorgänge zu untersuchen und aufzuklären, bieten sich prinzipiell zwei Wege an: Zum einen kann man die Reaktionen *in vitro*, d. h., im Reagenzglas und extrazellulär, ablaufen lassen, um sie anschließend zu analysieren, zum anderen kann man aber auch Vorgänge in der Zelle selbst, also *in vivo*, beobachten.

Um die Fragen 1 und 2 bearbeiten zu können, sollte zunächst ein *In vitro* -Spleißsystem entwickelt und optimiert werden. Damit sollten verschiedene Hefe-Actin-Transkripte, die mit Hilfe des SP6-Systems *in vitro* synthetisiert werden können, auf ihre Spleißeffizienz hin getestet werden. Die verwendeten Konstrukte unterscheiden sich entweder in der Länge ihrer Exon-Bereiche (Frage 1) oder in der Struktur ihres 5'-Endes (Frage 2).

Insbesondere bei der cap-Abhängigkeit erschien es sinnvoll, die erzielten *In vitro*-Ergebnisse durch einen *In vivo*-Versuchsansatz zu überprüfen. Deshalb sollten Hefezellen mit Plasmiden transformiert werden, die vor den Hefe-Strukturgenen Actin und MATa1 einen Promotor für RNA-Polymerase I besitzen. Die daraus resultierenden Transkripte sollten auf ihre Spleißeffizienz und zusätzlich auf ihre Polyadenylierung hin untersucht und mit entsprechenden RNA-Polymerase II-Transkripten verglichen werden. Damit sollte eine Aussage über eine mögliche Kopplung dieser Prozessierungsschritte mit der Transkription getroffen werden. Ausserdem tragen Polymerase I-Produkte, nämlich die 37 S-rRNAs, normalerweise kein cap am 5'-Ende, so daß auch zur Abhängigkeit der Spleißreaktion von einer 5'-cap-Struktur am Primärtranskript zusätzliche Ergebnisse zu erwarten waren.

2. Ergebnisse

2.1. Entwicklung und Charakterisierung eines zellfreien *In vitro*-Hefe-Spleißsystems

Um das Spleißen von Hefe-Primärtranskripten *in vitro* untersuchen zu können, müssen zwei wichtige Voraussetzungen gegeben sein: Ein *In vitro*-Transkriptionssystem, das effizient und zuverlässig gewünschte Vorläufer-RNAs zur Verfügung stellt, und ein Hefe-Zellextrakt, der ausreichende Spleiß-Aktivität besitzt.

Verschiedene *in vitro* Transkriptionssysteme werden heute kommerziell vertrieben, die sich der sehr spezifisch arbeitenden RNA-Polymerasen einiger Bakteriophagen bedienen; es handelt sich hierbei hauptsächlich um T7-, T3- und SP6-Polymerasen. In dieser Arbeit entschied man sich für das SP6-System: Die SP6-RNA-Polymerase stammt aus dem Phagen SP6, der *Salmonella typhimurium* infiziert. Das Enzym benötigt zur Transkription einen Promotor mit einer sehr spezifischen Sequenz, den man bei der Konstruktion von Transkriptionsvektoren dem Polylinker, in den zu transkribierende Sequenzen integriert werden können, vorschaltet.

Spleißextrakte waren und sind im Gegensatz dazu nicht kommerziell erhältlich und müssen daher selbst präpariert werden. Zum Zeitpunkt, als die vorliegenden Untersuchungen begonnen wurden, war noch keine Vorschrift für einen Spleißextrakt aus Hefe veröffentlicht. Es war daher zunächst das Ziel dieser Arbeit, einen zellfreien Extrakt aus *Saccharomyces cerevisiae* zu gewinnen, der Spleißaktivität besaß. Hilfreich waren in diesem Zusammenhang Hinweise aus dem Labor von J. Abelson, Pasadena. Als nach verschiedenen Präparationsansätzen schließlich ein aktiver Spleißextrakt erhalten wurde, wurde dieser zunächst dazu benutzt, die Reaktionsbedingungen des *In vitro*-Spleißprozesses zu charakterisieren und, wenn möglich, noch weiter zu optimieren. Die schließlich benutzte Vorschrift zur Extraktgewinnung und *In vitro*-Versuchsdurchführung entsprach, von geringen Abweichungen abgesehen, dem Vorgehen, das von Lin *et al.*, 1985, beschrieben wurde.

2.2.1. Herstellung von SP6-Transkripten

Ein Alu I-Fragment aus dem Hefe Actin-Gen (Gallwitz und Sures, 1980; Ng und Abelson, 1980) - es enthält das komplette Intron und einen Teil der flankierenden Exon-Sequenzen - wurde in eine SmaI-Schnittstelle des SP6-Transkriptionsvektors Proteus 6 (Geschenk von C.Rice, Pasadena) inseriert. Da *in vitro* Transkription mit diesem Konstrukt (Proteus-act-6) zwar möglich, aber nicht ausreichend ergiebig war, wurde daraus das BamHI-EcoRI-Fragment (die beiden Schnittstellen finden sich beiderseits benachbart der SmaI-Stelle) in die Polylinkerregion des Transkriptionsvektors pSP64 überführt. Mit dem resultierenden Plasmid pSPact64 wurde in einer Reihe von Versuchen gearbeitet. Da die SP6-Polymerase nicht an einer definierten Sequenz die Transkription abbricht - es sind keine spezifischen Terminationssignale bekannt - mußte der Vektor an einer geeigneten Stelle hinter der zu transkribierenden Sequenz linearisiert werden. Im vorliegenden Fall bot sich hierfür die Eco RI-Schnittstelle im Polylinker an.

Ein Transkript, das von diesem Konstrukt mittels der SP6-Polymerase abgelesen wurde, stellte sich folgendermaßen dar (Abb. 2): Es besaß ein Exon 1 von 114 Nukleotiden, wobei 41 davon aus der Polylinker-Region des Transkriptionsvektors pSP64 stammten, 73 dagegen vom Actin-Gen. Es folgte das komplette Wildtyp-Intron des Hefe-Actin-Gens von 309 Nukleotiden mit seinen konservierten Spleißsignalen: Am 5'-Ende GTATGT-, die TAACTAC-Box (oder auf RNA-Ebene die UACUAAC-Box) und am 3'-Ende -Pyrimidin-AG. Den Abschluß bildete ein Exon 2 von 162 Original-Actin-Nukleotiden und 7 Nukleotiden aus dem Polylinker.

SPact64-Transkript:

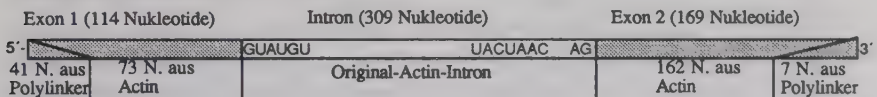


Abb. 2: Schematische Darstellung des SPact64-Transkripts: Exon-Bereiche sind schattiert dargestellt, und ihr Anteil an Original-Hefe-Actinsequenzen, bzw. Polylinker-Sequenzen ist angegeben. Vom Wildtyp-Actin-Intron (weißer Balken) sind die konservierten Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden aufgeführt, sowie die Gallwitz-Box. N. = Nukleotide

Die *In vitro*-Transkriptionsreaktion wurde nach Melton *et al.*, 1984, durchgeführt. Das *In vitro*-Transkript wurde immer nach der Reaktion durch Gelelektrophorese und anschließende Elution aus dem Gel gereinigt. So konnte man sicher sein, keine Längenunterschiede beim Ausgangstranskript, bedingt durch vorzeitiges Abfallen der

Polymerase oder durch Abbau der RNA, vorliegen zu haben, die ein Ergebnis bei Spleißversuchen sicherlich verfälscht hätten.

Die Transkription erfolgte meist unter Zusatz eines radioaktiv markierten Nukleotids (α - ^{32}P -UTP), das zusätzlich zum Nukleotid-Gemisch (je 500 μM ATP und CTP, je 250 μM GTP und UTP) der Reaktion zugesetzt wurde. Der Einbau an Radioaktivität in die fertigen Transkripte betrug beim Standard-Transkript ca. 20 bis 40 % der eingesetzten Menge. Das entsprach einer Ausbeute von ca. 8 bis 16 pMol oder 1- 2 μg Transkript pro μg DNA-Vorlage ($\approx 0,5$ pMol). Das heißt, von einem DNA-Plasmid wurden ungefähr 16 bis 32 Moleküle RNA abgelesen. Die Transkriptionseffizienz variierte im Rahmen dieser Arbeit jedoch mit den verwendeten Konstrukten.

Wenn nicht anders angegeben, trugen die Transkripte ein m^7GpppG - "cap" am 5'-Ende. Die SP6-Polymerase hat eine ausgeprägte Präferenz dafür, Transkripte mit einem cap-Analog m^7GpppG zu starten (Konarska et al., 1984), sofern dieses im Reaktionsansatz zur Verfügung gestellt wird (2 mM).

2.1.2. Herstellung eines Hefe-Spleißextrakts

Der Hefe-Spleißextrakt ist ein Gesamtzell-Extrakt und wurde aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm EJ 101) gewonnen. Dazu wurden die Zellen zunächst in einem Sorbitolpuffer mit dem Enzym Zymolyase behandelt, welches die Zellwände angreift. Danach nahm man sie in einem Puffer mit geringer Ionenstärke auf (Hypotonischer Schock) und brachte sie durch mechanische Krafteinwirkung mittel eines Glashomogenisators ("Douncer") zum Platzen. Daraufhin erhöhte man die Salzkonzentration auf 0,2 M KCl, um den Zellkern aufzuschließen (Hypertonischer Schock). Nach Abzentrifugieren größerer Partikel unterwarf man den Überstand einer S100-Ultrazentrifugation. Der Überstand daraus wurde dann nach Dialysieren gegen den endgültigen Puffer aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Dieser Hefe-Gesamtzell-Extrakt (S 100) hatte eine Spleißeffizienz, die mit den Ergebnissen in der Literatur (Lin et al., 1985) vergleichbar war. Leider ist die Methode, mit der der Spleißextrakt gewonnen wurde, nicht immer reproduzierbar; auf einen gelungenen Extrakt kamen mehrere ohne erkennbare Spleiß-Aktivität. Eine Rolle spielte hierbei sicherlich die Geschwindigkeit, mit der das Enzym Zymolyase die Zellwand der Zellen abverdaute.

Hierbei kam es zu erstaunlichen Unterschieden, die nicht mit den nur leicht variierenden Zelldichten und Enzymmengen zu erklären waren. Es kann festgestellt werden, daß ein Extrakt nach seiner Fertigstellung nur dann brauchbar war, wenn der Zellwandabbau nach einer Stunde soweit fortgeschritten war, daß ungefähr 90 % der Zellen in 10 % SDS platzten. Ein weiterer wichtiger Punkt war das mechanische Aufbrechen der Zellen nach dem hypotonischen Schock. Dies wurde durch Entnahme von Proben, die unter dem Mikroskop beobachtet wurden, kontrolliert. Die Widerstandskraft der Zellen, selbst nach weitgehender Schädigung der Zellwände und drastischem Anstieg des osmotischen Drucks durch Suspension in einem hypotonischen Puffer, war enorm. Offensichtlich wurde durch Platzen der ersten Zellen und der Freisetzung ihres Zellinhalts der osmotische Druck in den übrigen Zellen wieder soweit herabgesetzt, daß schon starke mechanische Kräfte nötig waren, sie noch aufzuschließen. Wie aber die Kontrolle unter dem Mikroskop nach dem hypotonischen Schock zeigte, war ein quantitativer Zellaufschluß nötig, um später im fertigen Extrakt ausreichend Spleißeffizienz zu erhalten. Ein wichtiger Punkt während der ganzen Prozedur war selbstverständlich, daß RNase-frei gearbeitet wurde.

2.1.3. Durchführung und Analyse der *In vitro*-Spleißreaktion

Die Reaktionen erfolgten normalerweise in 10 µl Ansätzen, wovon 4 µl der Extrakt beitrug. Nachdem die Spleißreaktion durch verschiedene Experimente charakterisiert worden war (siehe 2.1.4.), entschied man sich für die folgende Standard-Zusammensetzung: 40 % Extraktanteil, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 60 mM Kalium-Phosphat, pH 7.0. Dazu wurden ca. 0,1 nM exogene Prä-mRNA gegeben. Die Standard-Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei RT. Für die *In vitro*-Spleißversuche wurde radioaktiv markiertes Transkript eingesetzt, nur im Falle einer anschließenden Analyse durch "Primer Extension" nicht.

2.1.3.1. Analyse der Spleißreaktionen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der Regel wurden die *In vitro*-Spleißreaktionen durch anschließende Elektrophorese in einem denaturierenden, 8 %-igen Polyacrylamidgel analysiert. Bei dieser Gelkonzentration ist die Mobilität verzweigter RNA-Formen bei der Gelelektrophorese wesentlich geringer

als es ihrer Länge im linearisierten Zustand entsprechen würde. Die Spleißreaktion ist aber gerade durch die Entstehung von verzweigten RNA-Molekülen charakterisiert. Die beiden Lasso-Formen, das 2/3-Molekül (478 Nukleotide) als Intermediat und das Intron (309 Nukleotide) als eines der Endprodukte, liefen im 8 %-igen Gel oberhalb des Vorläufer-Moleküls (592 Nukleotide) und ermöglichten es so leicht, eine typische Prä-mRNA-Spleiß-Reaktion zu identifizieren (Abb. 3.)

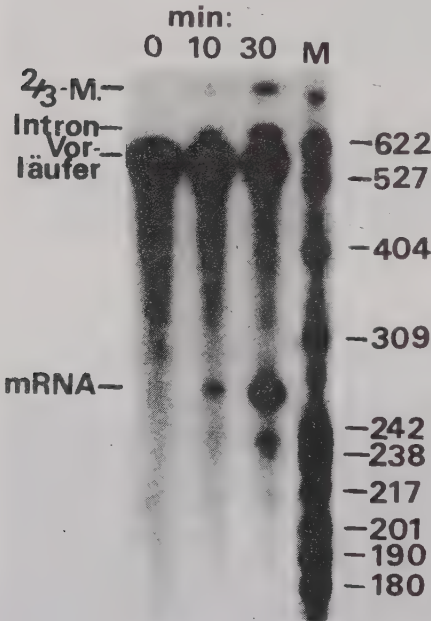


Abb. 3: Auftrennung der *In vitro*-Spleißreaktion mit dem SPact64-Transkript (3 Inkubationszeiten: 0, 10 und 30 Minuten) auf einem 8%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel. Zu sehen sind: 2/3-M.=2/3-Molekül aus Intron und Exon 2 von 478 Nukleotiden Länge, Intron von 309 Nukleotiden Länge (beide besitzen eine verzweigte Lassostruktur), Vorläufer = SPact64-Primärtranskript von 592 Nukleotiden Länge und mRNA = gespleißtes Produkt aus Exon 1 und Exon 2. M = pBR322 mit HpaII geschnitten.

Ansonsten konnte man mittels der Gelelektrophorese noch die linearen Moleküle der Prä-mRNA und der reifen, gespleißten mRNA (283 Nukl.) erkennen. Ein weiteres Zwischenprodukt, das freie Exon 1, sieht man wegen seiner Kürze (114 Nukl.) hier nicht.

2.1.3.2. Analyse von Spleißkomplexen

Man kann den mRNA-Spleißvorgang nicht nur auf RNA-Ebene, also durch Analyse der Substrate, Intermediate und Produkte der Spleißreaktion, untersuchen, sondern auch auf Proteinebene, indem man die Ausbildung von Spleißkomplexen betrachtet. Spleißkomplexe sind von Größe und Zusammensetzung am ehesten Ribosomen vergleichbar, weshalb sie im Englischen auch den Namen "Spliceosomes" erhalten haben. Sie besitzen als Komponenten neben der zu spleißenden RNA bestimmte Proteine und andere RNAs, die snRNAs. Um nachzuweisen, ob ein bestimmtes Transkript in der Lage war, vom Spleißkomplex gebunden zu werden, gab es zwei Möglichkeiten: Bei beiden wurde ein exogenes Transkript erst in einem Hefe-Spleißextrakt inkubiert, und dieser dann weiterbehandelt. Zum einen konnte man ihn einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation unterwerfen. Dabei sedimentierte der Spleißkomplex bei ca. 40 S. Ein Anstieg der Radioaktivität in einer entsprechenden Fraktion des Gradienten war ein Hinweis dafür, daß das Transkript ein geeignetes Substrat für die Bindung durch den Spleißkomplex darstellte, was allerdings - wie spätere Experimente zeigten - noch nichts über den Ablauf der Spleißreaktion selbst sagt. Eine andere Möglichkeit, Spleißkomplexe nachzuweisen, liegt in der gelelektrophoretischen Auftrennung von Spleißansätzen in nicht-denaturierenden Gelen, bei der ungebundenes Transkript im elektrischen Feld wesentlich schneller durch die Matrix wandert als eines, das durch Proteine gebunden ist und damit verlangsamt wird ("gel retardation").

Zur Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Glycerin-Gradienten im Bereich von 15 bis 40 % Glycerin gefahren. Der Gradient wurde bereits durch ein Gradienten-Mischgerät vorher grob eingestellt, dann mit dem Spleißreaktionsansatz (3-facher Standardansatz, 15 min, RT) überschichtet und 12 Stunden bei 35.000 upm (150.000 g) und 4°C zentrifugiert. Danach wurden der Gradient fraktioniert und die Radioaktivität, sowie die Dichte der Fraktionen bestimmt. Am günstigsten erwies es sich, eine Gesamt-Radioaktivitätsmenge in Form von ^{32}P -markiertem Transkript von ca. 100.000 bis 200.000 cpm pro Versuchsansatz einzusetzen; dann wurde die Cerenkov-Zählung weniger durch Meßschwankungen, bedingt z. B. durch elektrostatische Aufladung, verfälscht.

Die Radioaktivitätsverteilung im Gradienten, die bei Verwendung des Standardtranskripts SPact64 erzielt wurde, ist in Abb.4 graphisch dargestellt, wobei für jede Fraktion der prozentuale Anteil von cpm an der Gesamtmenge in allen Fraktionen angegeben ist. Der

erste Gipfel der Kurve entspricht dem 40 S-Spleißkomplex, der zweite hat nur mit unspezifischer Bindung des Transkripts zu tun und bei noch geringerer Dichte sedimentiert das ungebundene Transkript (steigende Fraktionsnummern = abnehmende Dichte). Als Vergleich ist daneben die Sedimentationskurve mit einem ansonsten identischen Transkript, das aber kein Intron enthält, aufgeführt: Hier fehlt der erste, für den Spleißkomplex spezifische Gipfel. Die Fraktionen des Glycerin-Gradienten für das SPact64-Transkript wurden nach der Radioaktivitätszählung und Dichtebestimmung auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (8 %) auf Spleißintermediate und -produkte hin untersucht (Abb. 5). Nur in den Fraktionen 9 bis 12, die dem 40 S-Gipfel entsprechen, können 2/3-Molekül und Intron festgestellt werden. Reifes Produkt ist dort nicht zu finden.

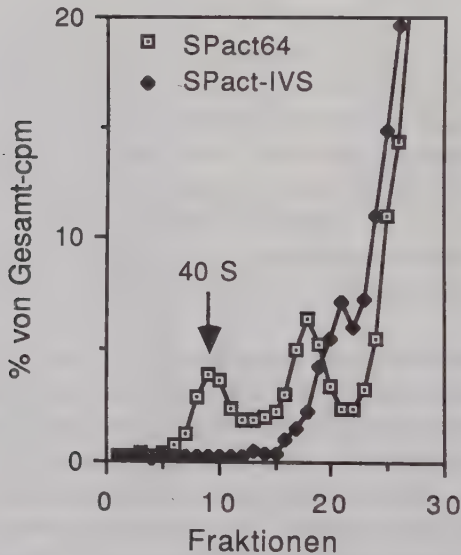


Abb.4: Glycerin-Dichtegradienten- Zentrifugation von zwei Spleißansätzen. Als Prä-mRNAs wurden ein Transkript von SPact64 (mit Actin-Intron) und eines von SPact-IVS (identisch mit dem anderen, aber ohne Intron) eingesetzt. Aufgetragen ist die Radioaktivitäts-Menge (in Prozent der im gesamten Gradienten gezählten cpm) gegen die Fraktionen. Der 40 S-Gipfel, typisch für den Spleißkomplex, ist mit einem Pfeil markiert.

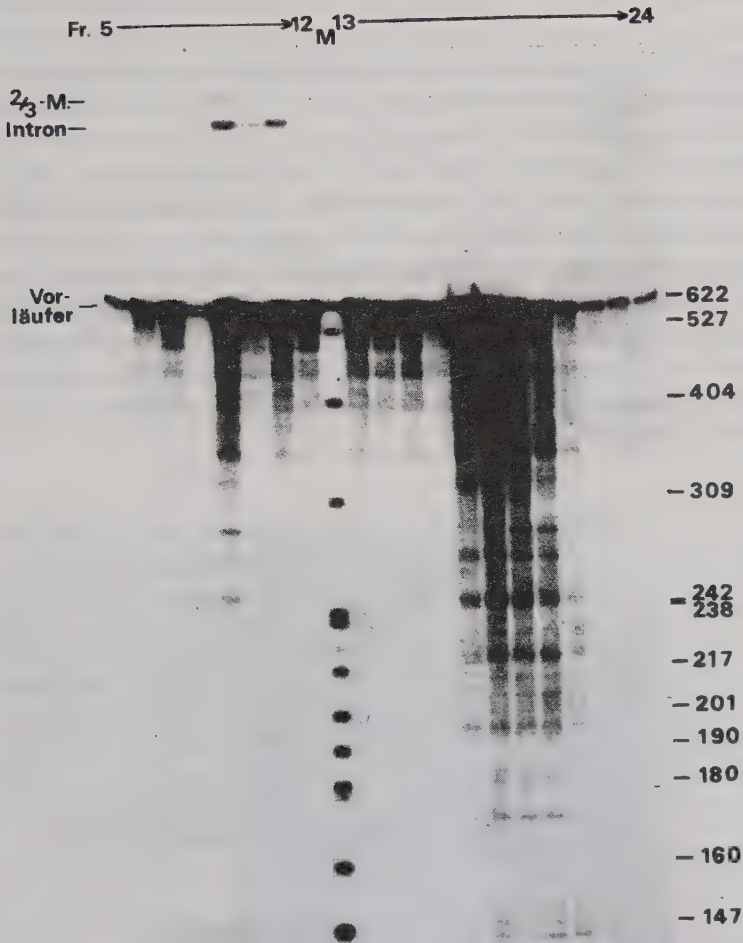


Abb. 5: Denaturierende Gelelektrophorese der einzelnen Glycerringradienten-Fractionen von Abb. 4 in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Die Fractionen wurden zuvor phenolextrahiert. Die Positionen von 2/3-Molekül, Intron und Vorläufer-Molekül sind angegeben. M = pBR322, mit HpaII geschnitten. Fr. = Fraction.

Als zweite Methode eignete sich die Verwendung von sogenannten "zusammengesetzten" Gelen (engl. "composite gels") aus Agarose (0,5 %) und Polyacrylamid (3 %, Vernetzung 160 : 1) zur Auftrennung von Spleißkomplexen. Wenn man einen Spleißansatz mit radioaktivem Transkript auftrug und die Elektrophorese für ca. 16 Stunden bei 4°C und 100 V durchführte, wanderte von Protein gebundenes Transkript wesentlich langsamer als ungebundenes. Um spezifische Bindung durch den Spleißkomplex (S) von unspezifischer Bindung (U) zu unterscheiden, wurde jeweils eine Kinetik aufgetragen: D.h. die Spleißreaktionen wurden vor dem Auftragen verschieden lang inkubiert (0 bis 20 min). Als Kontrolle diente ein Spleißansatz, bei dem $MgCl_2$ weggelassen und EDTA zugegeben wurde; unter solchen Bedingungen findet kein Spleißen statt. Mit dieser Methode können zwar im Idealfall mehrere Spleißkomplexe unterschiedlicher Größe (*Pikielny und Rosbash*, 1986), bezeichnet mit I, II und III, aufgetrennt werden, wobei I und III wahrscheinlich Vorstufen von II sind. Dies gelang im vorliegenden Fall leider nicht mit dieser Deutlichkeit, so daß nur die Schlußfolgerung "Spleißkomplex-Ausbildung: Ja oder Nein" möglich war (Abb. 6).

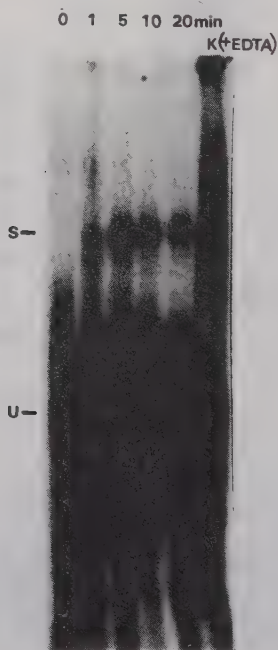


Abb. 6: Auftrennung von Spleißkomplexen durch nicht-naturierende Gelelektrophorese in einem zusammengesetzten Gel (3% Polyacrylamid, 0,5% Agarose). Es wurde eine Standard-Spleißreaktion mit einem SPact64-Transkript durchgeführt, von der zu Beginn und nach 1, 5, 10 und 20 Minuten Proben entnommen wurden. K = Reaktionsansatz mit dem gleichen Transkript ohne $MgCl_2$, aber mit EDTA. S = Spleißkomplex; U = unspezifischer Komplex.

2.1.4. Untersuchung der *In vitro*-Spleißbedingungen

Um zu ermitteln, welche Bedingungen für eine Spleißreaktion *in vitro* optimal sind, wurden verschiedene Parameter bei den Experimenten variiert:

2.1.4.1. Zeitabhängigkeit

Zunächst wurde die Zusammensetzung des Spleiß-Puffers konstant gehalten, d. h. sie war wie unter 2.1.3. beschrieben. Dagegen wurde die Inkubationszeit der Reaktion variiert. Folgende Zeiten wurden gewählt: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 und 90 Minuten (Abb. 7)

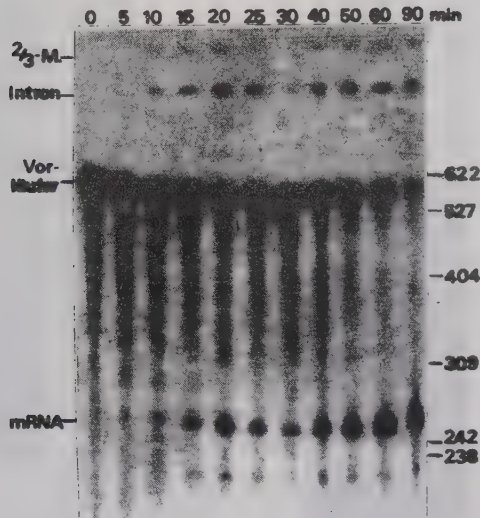


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der *In vitro*-Spleißreaktion. Analyse von Standard-Spleißreaktionen (mit dem Transkript von SPact 64), die verschieden lang inkubiert wurden, nämlich 0 bis 90 Minuten. Die Auftrennung erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel.

Wie unschwer zu sehen ist, waren bereits nach 10 Minuten Zwischen- und Endprodukte der Reaktion vorhanden, wenn auch noch nicht gut zu erkennen. Nach 20 Minuten hatte ihre Konzentration einen Wert erreicht, der danach nicht mehr wesentlich anstieg. In späteren Experimenten wurde daher eine Standard-Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt, die nur in Ausnahmefällen verlängert wurde.

2.1.4.2. Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

Zunächst wurde der bei der Reaktion notwendige Anteil von Zellextrakt ermittelt. Es wurden nur Konzentrationen, die unterhalb der üblichen 40% lagen, getestet und zwar: 10%, 20% und 30%. Während geringe Spleißaktivität schon bei 20% Extrakt-Anteil begann, erreichte sie erst bei 30% ein akzeptables Maß, war aber bei 40% am größten (Abb. 8).

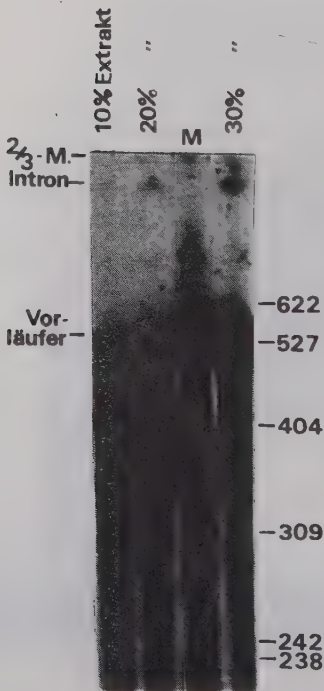


Abb. 8: Abhängigkeit der Spleißreaktion vom Extraktanteil. Analyse von Spleißreaktionen mit dem SPact64-Transkript durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (8%): Der Extraktanteil wurde variiert: 10%, 20% und 30%. M = pBR322, mit HpaII geschnitten.

Als nächstes wurden die einzelnen Spleißpuffer-Komponenten untersucht. Nach der ursprünglichen Vorschrift war MgCl_2 , also Mg^{++} , unbedingt für die Reaktion erforderlich: Tatsächlich wurde das Spleißen eines *in vitro* Transkripts im Extrakt durch Weglassen von MgCl_2 und Zugabe von EDTA unterbunden (Abb. 9). Nur der Verzicht auf MgCl_2 allein führte zwar zu einer starken Reduzierung der Spleißaktivität des Extrakts, nicht aber zu deren Verlust. Offensichtlich befinden sich im Extrakt selbst noch ausreichend zweiwertige Ionen, um eine Restaktivität zu erhalten. Diese werden durch EDTA jedoch abgefangen, was die Spleißreaktion dann verhindert.

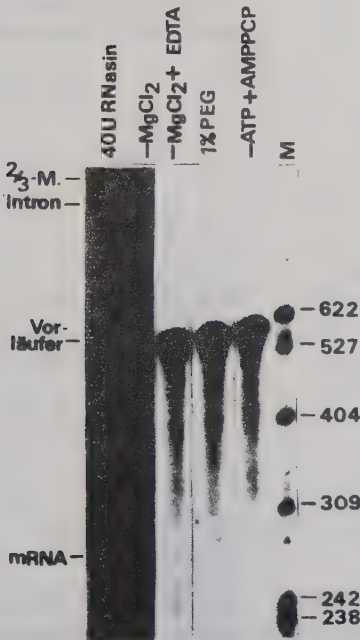


Abb. 9: Verschiedene Reaktionsbedingungen der Spleißreaktion. Analyse von Spleißreaktionen durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Abweichungen von den Standardbedingungen: Zugabe von 40 U RNasin; Weglassen von MgCl_2 ; Weglassen von MgCl_2 und Zugabe von 10 mM EDTA; 1% PEG; Weglassen von ATP und Zugabe von AMPPCP. M = pBR322, mit HpaII geschnitten.

Beim Vergleich verschiedener Konzentrationen von MgCl_2 (0,5, 1, 2,5, 5, 10 mM) im Ansatz war 5 mM optimal (Abb. 10). Interessant war aber vor allem, daß die Reaktion

nicht speziell Mg^{++} als Kofaktor benötigt, sondern daß sie andere zweiwertige Ionen ebenfalls benutzen kann. So konnten typische Intermediate und Endprodukte der Spleißreaktion auch bei Verwendung von $MnCl_2$, $CoCl_2$ und $ZnCl_2$ nachgewiesen werden (Abb. 11).

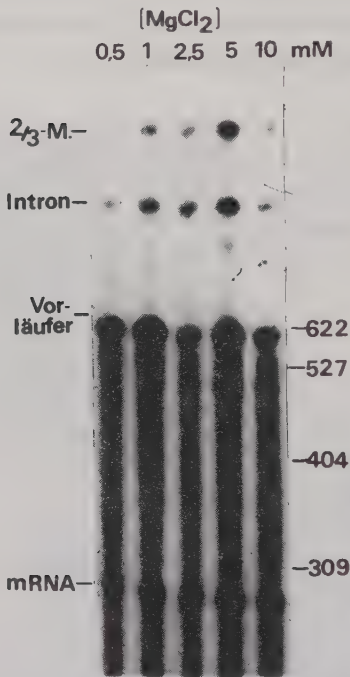


Abb. 10: Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration auf die Spleißreaktion. Analyse der Spleißreaktionen durch denaturierende Gelelektrophorese in 8%igen Polyacrylamidgelen. Verwendete $MgCl_2$ -Konzentrationen: 0,5mM, 1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM. Die Marker-Positionen von pBR322, mit HpaII geschnitten, sind angegeben.

ATP wird ebenfalls zur Spleißreaktion benötigt und zwar offensichtlich für den ersten Schritt. Hier war nach der Standardanleitung eine Konzentration von 2 mM im Ansatz nötig. Ähnlich wie bei den zweiwertigen Ionen führte aber ein Weglassen von ATP im Spleißpuffer noch nicht zum völligen Stoppen der Reaktion (ohne Abbildung); es waren auch hier wohl noch Restmengen im Extrakt selbst vorhanden. Gab man aber ein ATP-Analog, nämlich 10 mM Adenosin-5'-(beta-gamma-methylen)-triphosphat (AMPPCP), als kompetitiven Hemmstoff zur Reaktion, kam sie vollständig zum Erliegen (Abb. 9)

Abb. 11: Einfluß verschiedener zweiwertiger Ionen auf die Spleißreaktion. Statt MgCl_2 wurden in der Reaktion eingesetzt: je 2,5 mM MnCl_2 , CoCl_2 und ZnCl_2 . Die Inkubationszeit betrug 15, bzw. 60 Minuten. Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Die Markerpositionen für pBR322, mit HpaII geschnitten, sind angegeben.

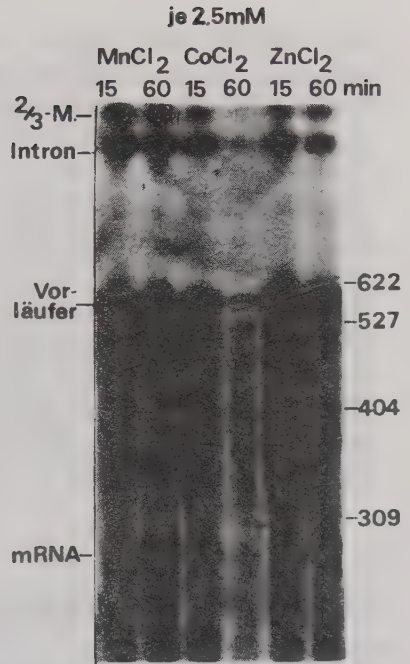
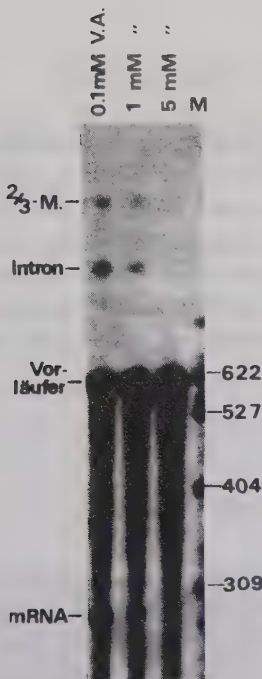


Abb. 12: Einfluß verschiedener Konzentrationen - 0,1mM, 1mM und 5mM - von Vanadyl-Adenosin auf die Spleißreaktion. Analyse der Spleißreaktion durch denaturierende Gelelektrophorese im 8%igen Polyacrylamidgel. M= pBR322, mit HpaII geschnitten.

Auch Polyethylenglykol (PEG) war wichtig für die *In vitro*-Spleißreaktion. Es führt offensichtlich zu einer Konzentrierung der Reaktionspartner, die wichtig ist. Eine Herabsetzung der Standardkonzentration von 3% auf 1% brachte jede Spleißaktivität des Extrakts zum Stillstand (Abb. 9).

Um zu untersuchen, ob RNase-Inhibitoren zu einer Veränderung der Spleißreaktion führen, wurden zwei davon eingesetzt, Vanadyl-Adenosin und RNasin: Die *In vitro*-Spleiß-Reaktion wurde durch Zugabe einer größeren Menge Vanadyl-Adenosin (Adenosin-Analog) inhibiert (Abb. 12). Während eine Konzentration von 0,1 mM noch keine Wirkung zeigte, wurde die Spleißreaktion bei 1 mM schon stark beeinträchtigt und kam bei 5 mM völlig zum Erliegen. Einen ähnlichen Effekt gab es bei der Zugabe des RNase-Inhibitors aus menschlicher Plazenta, RNasin (40 U pro Ansatz), nicht (Abb. 9), allerdings auch keine entgegengesetzte, günstige Beeinflussung der Reaktion durch z. B. einen geringeren Abbau der RNA.

2.2. Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Länge der Exons

Um zu prüfen, ob Exons eine bestimmte Mindestlänge besitzen müssen, damit mRNA-Vorläufer gespleißt werden, wurden Varianten des oben verwendeten SPact64-Transkripts konstruiert, deren Exons spezifisch verkürzt waren: Zum einen verkürzte man die Exons am fertigen SP6-Transkript durch RNaseH-Verdau, zum anderen veränderte man den Transkriptionsvektor durch gezielte Mutagenese so, daß von ihm Transkripte mit spezifisch verkürztem Exon 1 abgelesen wurden. Durch geeignete Restriktionsspaltungen am Transkriptionsvektor konnten auch spezifische Verkürzungen im zweiten Exon erzielt werden.

2.2.1. Exon-Verkürzung durch RNase H-Verdau

Das SPact64-Transkript wurde durch RNase H-Verdau in den Exon-Bereichen an bestimmten Stellen verkürzt: Verschiedene Oligodeoxynukleotide wurden konstruiert, die zu verschiedenen Regionen der Actin-Vorläufer-mRNA komplementär waren. Diese wurden an das radioaktiv markierte *In vitro*-Transkript von pSPact64 anhybridisiert, und

dieses Hybridmolekül dem RNase H-Verdau unterworfen. RNase H hydrolysiert RNA spezifisch in doppelsträngigen RNA/DNA-Bereichen. Es blieben nur die RNA-Bereiche beiderseits der Hybridisierungsstelle übrig. Die hier verwendeten Oligodeoxynukleotide (siehe Abb.13) waren zu Bereichen in den beiden Exons der Actin-Prä-mRNA komplementär, die unterschiedlich weit von der jeweiligen Exon-Intron-Grenze entfernt waren. In einem Fall wurde sogar noch das erste Nukleotid des Introns mit abgedeckt. Nach dem RNase H-Verdau verblieb ein Transkript, das den Rest des so behandelten Exons, das Wildtyp-Intron und das andere unbehandelte Exon (analog zum normalen SPact 64-Transkript) umfaßte. Dieses Produkt wurde durch Gelelektrophorese von den übrigen Reaktionsteilnehmern (Oligodeoxynukleotid, abgeschnittener Exon-Bereich, Ribonukleotide) abgetrennt. Leider kann man allerdings bei Versuchen dieser Art nie auf das Nukleotid genau sagen, wo exakt der RNase H-Verdau stattgefunden hat, so daß man auch die verbleibenden Exon-Längen nicht auf Nukleotid genau angeben kann. Daher handelte es sich hier auch nur um Vorversuche, um ungefähre Anhaltspunkte für die später erfolgenden Mutagenesen zu finden.

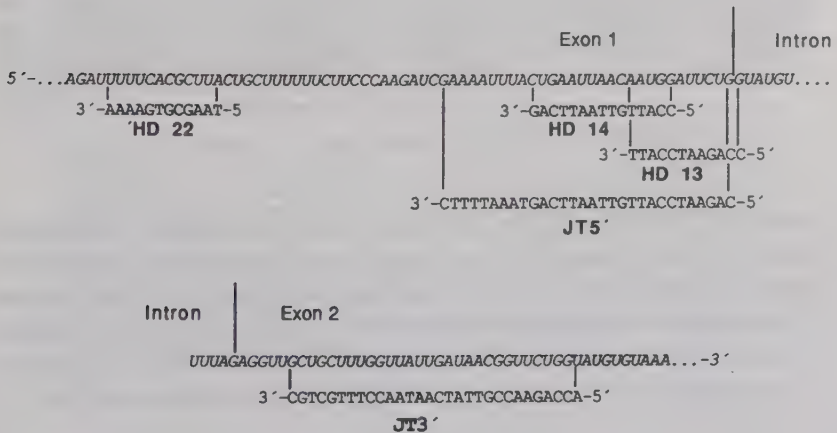


Abb. 13: Exon-Verkürzungen am SPact64-Transkript durch RNaseH-Verdau: Angegeben sind Teile der Sequenz des Hefe-Actin-Primärtranskripts (kursiv) aus dem ersten und zweiten Exon mit jeweils angrenzenden Intron-Bereichen, sowie die Sequenz verschiedener Oligodeoxynukleotide (Normalschrift) und ihre Bezeichnungen (Fettdruck). Die Bereiche in denen sie zur RNA komplementär sind, werden durch senkrechte Striche markiert.

Tabelle 1 gibt die theoretischen Exon-Minimal-Längen der verschiedenen Konstrukte nach RNase H-Verdau an. Als Kontrolle dienten Standard-Transkripte von SPact 64, die entweder ein "cap" am 5'-Ende trugen oder mit Phosphatase behandelt worden waren und deshalb eine OH-Gruppe am 5'-Ende tragen sollten, wie es auch nach der Behandlung von Transkripten mit RNase H der Fall ist. Damit sollte ein evtl. "cap"-Effekt von einem Exon-Längen-Effekt unterschieden werden können.

	<u>Oligodeoxynukleotid</u>	<u>Länge Exon 1</u>	<u>Länge Exon 2</u>	<u>Spleißreaktion</u>
a)	HD 13	- 1	169	nein
b)	HD 14	6	169	nein
c)	HD 22	50	169	ja
d)	-- (=K mit 5'-cap)	114 (+ cap)	169	ja
e)	JT 5'	0	169	nein
f)	JT 3'	114 (+ cap)	5	ja
g)	-- (=K mit 5'-OH)	114	169	ja

Tabelle 1: Exon Verkürzungen am Actin-Transkript SPact64 durch RNaseH-Verdau: Für die Fälle a) bis g) sind die Oligodeoxynukleotide angegeben, die vor dem RNaseH-Verdau an das Transkript anhybridisiert wurden, bzw. falls dies nicht der Fall war, ob das Kontrolltranskript SPact64 (K) eine 5'-cap-Struktur oder ein 5'-OH-Gruppe trug. Die resultierenden Längen von Exon 1 und Exon 2 sind aufgeführt, ebenso, ob eine Spleißreaktion stattfinden kann oder nicht. Bei a) fehlt nicht nur Exon 1 ganz, sondern auch noch das erste Nukleotid des Introns, nämlich das G aus dem hochkonservierten GT-Dinukleotid.

Abb.14 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs, wie es auch in der Tabelle 1 festgehalten wurde. Anhand der verzweigten Moleküle 2/3-Molekül (Zwischenprodukt) und Intron (eines der Endprodukte) konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Spleiß-Reaktion stattgefunden hatte oder nicht, wobei das noch nicht automatisch bedeutete, daß auch eine reife mRNA gebildet worden war. Dies konnte hier nicht eindeutig ermittelt werden, da die Vorläufer-RNA in allen Fällen viele Abbau-Banden aufwies.

Es machte keinen Unterschied, ob das Kontroll-Transkript ein cap (d) oder eine OH-Gruppe (g) am 5'-Ende trug. Auch eine Verkürzung der Exon 1-Länge auf ca. 50 Nukleotide (c) führte zu keiner sichtbaren Reduzierung der Spleißeffizienz. Allerdings wurde eine Vorläufer-mRNA mit einem ersten Exon von ca. 6 Nukleotiden (b) nur noch sehr ineffizient gespleißt und Transkripte, bei den Exon 1 ganz (e) oder zusätzlich noch das erste Nukleotid vom Intron (a) fehlten, waren überhaupt kein Substrat mehr für die

Spleißreaktion. Eine Reduzierung des zweiten Exons auf ca. 5 Nukleotide (f) führte zu keiner Beeinträchtigung der Spleißeffizienz.

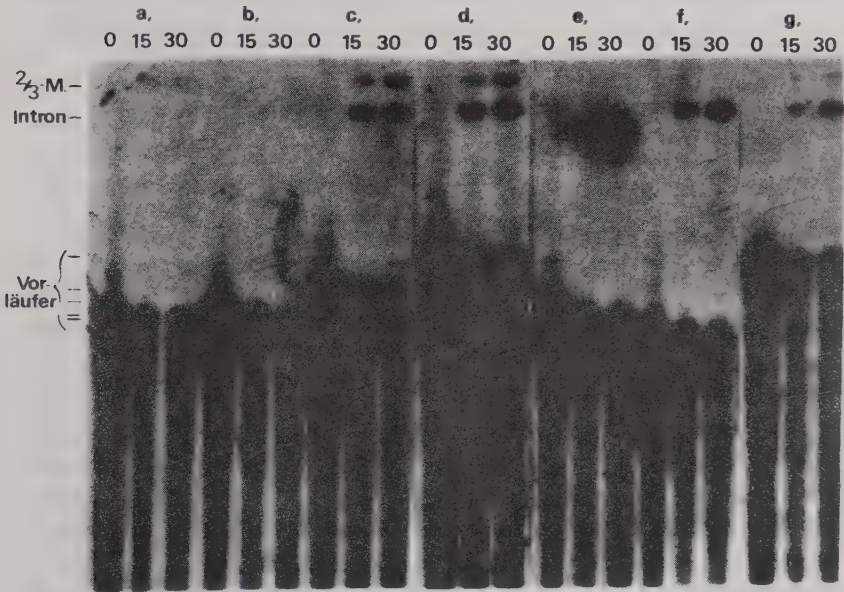


Abb. 14: Auswirkung von Exon-Verkürzungen am SPact64-Transkript durch RNaseH-Verdau auf die Spleißeffizienz der resultierenden Konstrukte. Analyse der Spleißreaktionen durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. a) vollständige Deletion des 1. Exons, einschließlich des ersten Nukleotids des Introns, Exon 2: 169 Nukleotide; b) Exon 1: 6 Nukleotide, Exon 2: 169 Nukleotide; c) Exon 1: 50 Nukleotide, Exon 2: 169 Nukleotide; d) SPact64-Kontrolle mit 5'-cap; e) Exon 1: vollständig deletiert, Exon 2: 169 Nukleotide; f) Exon 1: 114 Nukleotide, Exon 2: 5 Nukleotide g) SPact64-Kontrolle mit 5'-OH-Gruppe. Die Positionen für die verschiedenen Vorläufer-Moleküle sind angegeben, sowie die von 2/3-Molekül und Intron.

2.2.2. Verkürzung des ersten Exons durch gezielte Mutagenese *in vitro*

Hier war es das Ziel, das SPact64-Transkriptionsplasmid durch gerichtete Mutagenese so zu modifizieren, daß die resultierenden Transkripte direkt mit Original-Exon 1-Sequenzen

anfangen, ohne davorliegende Polylinker-Sequenzen. Ausserdem sollte so die Länge des ersten Exons aufs Nukleotid genau festgelegt werden können. Dabei wurden mehrere Konstrukte hergestellt, die in der Länge des ersten Exons variierten. Die so erhaltenen *In vitro*-Transkripte wurden auf ihr Spleißverhalten in Extrakten und auf Spleißkomplex-Ausbildung hin untersucht.

2.2.2.1. Herstellung der Exon 1-Mutanten

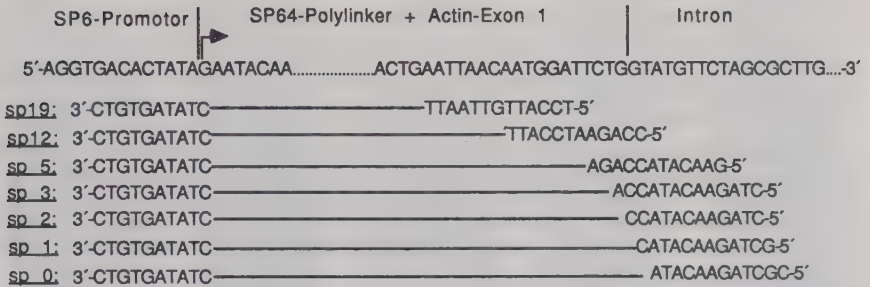
In Abb. 15 a, sind die der Mutagenese vorausgehenden Klonierungsschritte schematisch dargestellt. Wie bereits unter 2.2.1. beschrieben, wurde ein Actin-AluI-Fragment in die SmaI-Stelle des SP6-Vektors Proteus 6 inseriert. Daraus (pSPact6) wurde ein BamHI-EcoRI-Fragment in die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen im Polylinker des Transkriptionsvektors pSP64 ligiert, woraus das Konstrukt pSPact64 resultierte. Aus diesem nun wurde das SphI-EcoRI-Fragment herausgeschnitten, das den kompletten SP6-Promotor und die daran anschließenden Polylinker- und Actin-Sequenzen trug. Es wurde in die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen im Phagen M13mp18 eingesetzt, der damit zu M13mp18act wurde. Dessen einzelsträngige Form wurde zur gerichteten Mutagenese mit Oligodeoxynukleotiden eingesetzt, wodurch nicht gewünschte Polylinker- und Exon 1-Sequenzen aus dem transkribierten Bereich deletiert wurden. Nach erfolgreicher Mutagenese wurde nur in einem Fall das nun veränderte SphI-EcoRI-Fragment wieder in den Ausgangsvektor zurückgebracht, um eine bessere Transkriptionsausbeute zu erreichen. Meist konnte aber direkt doppelsträngige Phagen-DNA zur Transkription eingesetzt werden.

Um gezielte Deletionen an einzelsträngiger Phagen-DNA vornehmen zu können, wurden zunächst bestimmte Oligodeoxynukleotide benötigt, die an Bereiche beiderseits der zu deletierenden Sequenzen hybridisieren können. Die Sequenzen der sieben verwendeten Oligodeoxynukleotide und die Bereiche im M13mp18act, zu denen sie jeweils komplementär sind, sind in Abb. 15 b angegeben. Bei der gerichteten Mutagenese wurden die Oligodeoxynukleotide an die einzelsträngige Phagen-DNA hybridisiert, wobei der zu deletierende Bereich in der Vorlage nicht basenpaaren konnte und daher vom doppelsträngigen Bereich ausstülpte. Vom Oligodeoxynukleotid ausgehend wurde nun mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* der zweite, komplementäre Strang zur einzelsträngigen, zirkulären Phagen-DNA gebildet. Ligasebehandlung führte zum kovalenten Ringschluß.

a)



b)



c)

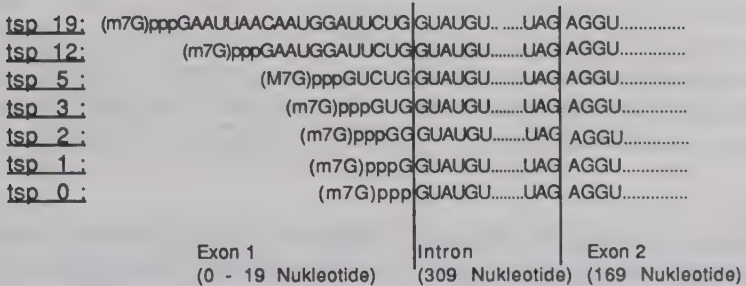


Abb.15: Deletion von Actin-Exon1-Sequenzen durch gerichtete Mutagenese.

a) Schematische Darstellung der Klonierungsschritte, die vor der gerichteten Mutagenese vorgenommen wurden. E1 = Exon 1, E2 = Exon 2, I = Intron (langer schwarzer Balken). Der kurze schwarze Balken steht für den SP6-Promotor mit Transkriptionsstart (Pfeil).

b) Sequenz der Oligodeoxynukleotide sp 19 bis sp 0, die zur gerichteten Mutagenese eingesetzt wurden und die komplementär zu einem Strang von M13mp18act (obere Zeile) waren.

c) Ausschnitt aus der Sequenz der Transkripte tsp 19 bis tsp 0, die nach erfolgreicher Mutagenese von den Konstrukten M13mp18actΔE1 durch die SP6-RNA-Polymerase abgelesen wurden.

Mit diesen Hybrid-Molekülen - einer der beiden Stränge war unverändert, der andere zu ihm in weiten Teilen komplementär, aber ohne den deletierten Bereich - wurden Bakterien transformiert, anschließend die erwünschten Mutanten durch Plauehybridisierung mit dem mutagenen Oligodeoxynukleotid ermittelt, und daraus die mutierte doppelsträngige Phagen-DNA isoliert. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde überprüft, ob die Deletion aufs Nukleotid genau korrekt verlaufen war. Wenn dies der Fall war, konnte die DNA geschnitten und zur SP6-Transkription eingesetzt werden, wobei die Transkripte, wie in Abb. 15 c, dargestellt, aussahen. Mit dieser Methode wurden sieben Konstrukte erhalten, die Exon 1-Sequenzen von 19, 12, 5, 3, 2, 1 und 0 Nukleotiden Länge hatten. Sämtliche Nukleotide entsprachen der Original-Actin Sequenz aus Hefe, nur das erste wich in den Fällen tsp 12, 5, 3 und 2 ab: Es war nämlich immer ein Guanodin, weil die SP6-Polymerase dieses Nukleotid als Startnukleotid bevorzugt. Bei den Konstrukten tsp 19, 1 und 0 entsprach dieses Guanodin der Wildtyp-Sequenz. Im übrigen besaßen die Transkripte alle das Wildtyp-Actin-Intron von 309 Nukleotiden Länge und ein Exon 2 von 169 Nukleotiden Länge, wenn der Transkriptionsvektor mit EcoRI gespalten worden war, wie es bei den folgenden Experimenten der Fall war. Die Herstellung der oben aufgeführten Konstrukte - Klonierung, Mutagenese und Sequenzierung - wurde von A. Schweizer und Dr. M. Duchène durchgeführt.

Die Transkription erfolgte unter Standardbedingungen direkt unter Verwendung der doppelsträngigen Phagen-DNA (alle bis auf tsp 5) oder eines Konstrukts, bei dem das mutierte SphI- EcoRI- Fragment wieder zurück in die entsprechenden Schnittstellen von pSP64 gesetzt worden war (tsp 5). Die Transkripte wurden sowohl mit cap am 5'-Ende, als auch mit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende synthetisiert. Da die Ergebnisse für beide Formen identisch waren, werden hier nur die für die Transkripte mit "cap" gezeigt.

Die Spleißreaktionen aller Transkripte erfolgten nach Standardbedingungen und für verschiedene Inkubationszeiten (0, 15, 30, 45 und 60 Minuten), um sicher sein zu können, daß evtl. Effekte nicht nur durch eine Verlangsamung der Reaktion zustande kamen.

2.2.2.2. Analyse der Spleißreaktionen

Die Reaktionen wurden durch denaturierende Gelelektrophorese in 8 %-igen Polyacrylamidgelen analysiert. In Abb. 16 sind Ausgangsprodukt Vorläufer-mRNA (I),

Zwischenprodukt 2/3-Molekül (II) und Endprodukte Intron (III) und mRNA (IV) der verschiedenen Versuchsreihen zu erkennen: Transkripte mit Exon 1-Längen von 19 (A=tsp 19) und 12 Nukleotiden (B=tsp 12) wurden korrekt gespleißt. Die reife mRNA von tsp 12 konnte bei diesem Experiment so nicht identifiziert werden. Durch Primer-Extension konnte aber zweifelsfrei die Ausbildung dieses Endprodukts nachgewiesen werden (Abb. 17).

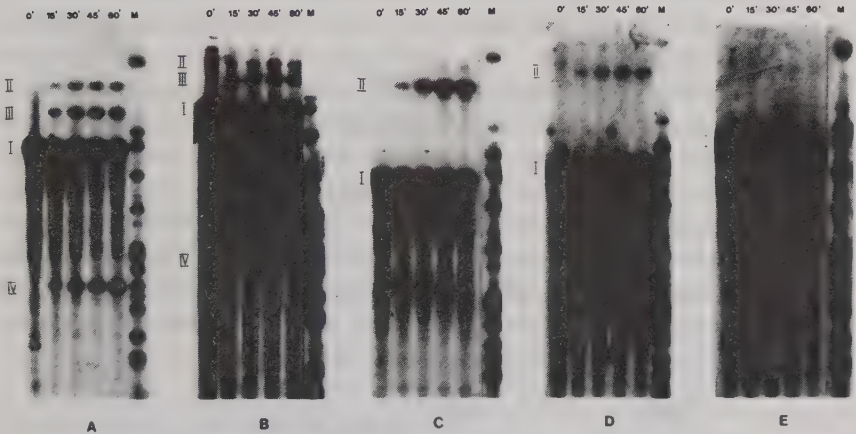


Abb. 16: Actin-Exon1-Verkürzungen durch gerichtete Mutagenese: Analyse der Spleißreaktionen mit den veränderten Transkripten durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Verwendete Transkripte: A = tsp 19; B = tsp 12; C = tsp 5; D = tsp 1; E = tsp 0. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten verwendet: 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten. I = Vorläufer-RNA; II = 2/3-Molekül; III = Intron; IV = mRNA.

"Primer Extension" ist eine weitere, sehr empfindliche Methode, Spleißen nachzuweisen. Hier benötigte man als Primer das radioaktiv markierte Oligodeoxynukleotid ST 10, das an die ersten 20 Nukleotide des zweiten Exons von Actin hybridisieren konnte. Stellte man der Reversen Transkriptase nur drei Deoxyribonukleotide (dNTPs), hier dATP, dCTP und dGTP, und ein Dideoxynukleotid (ddNTP), hier ddTTP, zur Verfügung, stoppte sie mit der Verlängerung des Primers - sie erfolgte komplementär zur RNA-Vorlage - am ersten Adenosin in der RNA, da sie hier ein ddTTP einbauen mußte, das keine 3'-OH-Gruppe für eine weitere Phosphodiesterbindung zu Verfügung stellen kann. Wenn man *in vitro* ein Primärtranskript (SPact64) der Spleißreaktion unterwarf, konnte danach das ST 10- Oligodeoxynukleotid an drei Formen von Molekülen hybridisieren, die alle ein

zweites Exon besaßen: Das Vorläufer-Molekül, das 2/3-Molekül und die reife mRNA. Bei den beiden ersten Molekülen befindet sich vor dem zweiten Exon noch das Intron, bei letzterem das erste Exon. Im Intron kam - von der Grenze zum Exon 2 aus gesehen - das erste Adenosin 2 Nukleotide 5' davon, im ersten Exon erst 6 Nukleotide 5' davon. Ein ST10-Oligodeoxynukleotid, das an Vorläufer- oder 2/3-Molekül band, wurde also von der Reversen Transkriptase um 2 Nukleotide verlängert, eines, das an reife mRNA hybridisierte, um 6 Nukleotide. Ein zweiter A-Rest kam im Intron noch 8 Nukleotide 5' von seinem 3'-Ende und wurde in geringem Umfang als zweiter Stop von der Reversen Transkriptase benützt.

Nach erfolgter Primer Extension wurde die RNA alkalisch hydrolysiert, und die einzelsträngigen DNA-Moleküle konnten gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Folgende Hauptbanden wurden, sofern Spleißen stattgefunden hatte, identifiziert: Die "Primer"-Bande des radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotids, das die Ausgangslänge von 20 Nukleotiden hatte, eine Bande von 22 Nukleotiden Länge für Vorläufer-RNA und 2/3-Molekül (dafür steht auch eine zweite Bande von 28 Nukleotiden Länge, die allerdings nur wenige Prozentanteile ausmacht) und eine Bande von 26 Nukleotiden Länge für reife mRNA. Mit dieser Methode konnte auch recht gut das Verhältnis von reifer mRNA zu Vorläufer-RNA plus 2/3-Molekül quantitativ abgeschätzt werden.

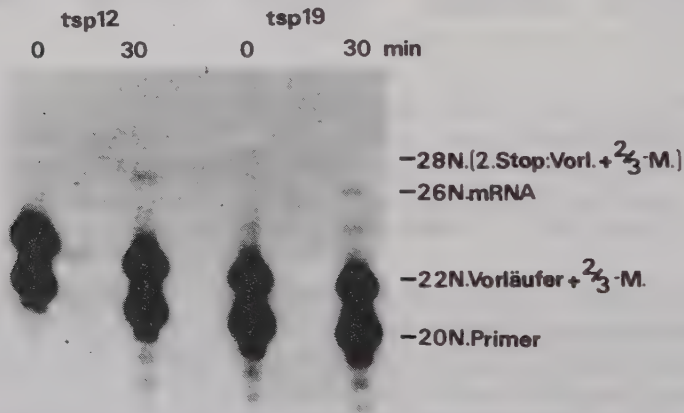


Abb. 17: Analyse von Spleißreaktionen mit Transkripten, deren erstes Exon verkürzt ist, durch "Primer Extension" in Gegenwart eines Dideoxynukleotides: Die Transkripte tsp 19 und tsp 12 wurden jeweils zu Beginn der Inkubation im Spleißextrakt (0 Minuten) und nach 30 Minuten analysiert. Primer: ST10-Oligodeoxynukleotid von 20 Nukleotiden Länge. ddNTP = ddTTP. Im Fall von Vorläufer-RNA oder 2/3-Molekül wird der Primer von der reversen Transkriptase auf 22 Nukleotide verlängert (zu einem geringen Teil auch auf 28 Nukleotide), im Fall von reifer mRNA auf 26 Nukleotide.

Die Konstrukte mit Exon 1-Längen von 5 (C=tsp 5), 3 und 2 Nukleotiden (hier nicht abgebildet) und 1 Nukleotid (D=tsp 1) konnten nur mehr den ersten Schritt der Reaktion durchlaufen, wie wiederum durch denaturierende Gelelektrophorese der Reaktionsteilnehmer gezeigt werden konnte (Abb. 16). Auch durch zehnfach längere Exposition bei der Autoradiographie, als hier gezeigt, tauchten keine weiteren Banden, die auf verzweigte Moleküle (Intron als eines der Endprodukte) hingewiesen hätten, auf. Offensichtlich werden also nur noch der Schnitt zwischen Exon 1 und Intron und die gleichzeitige Ausbildung des verzweigten 2/3-Moleküls aus Intron und Exon 2 vollzogen, nicht mehr der folgende Schnitt zwischen Intron und Exon 2, die Verknüpfung der beiden Exons miteinander und die Freisetzung des Introns in Lassoform. Bei tsp 1 erfolgt allerdings auch der erste Schritt der Reaktion schon wesentlich ineffizienter als bei den anderen Konstrukten mit längeren Exon 1-Sequenzen. Ein Transkript, das am 5'-Ende kein Exon 1 (E = tsp 0 in Abb. 16) mehr trägt, statt dessen vor dem Intron nur noch ein cap oder eine Triphosphatgruppe besitzt, war nicht mehr ein Substrat für die Spleißreaktion, auch nicht für deren ersten Schritt.

2.2.2.3. Analyse von Spleißkomplexen

Um die Frage zu klären, ob Transkripte, die die Spleißreaktion gar nicht oder nur teilweise durchlaufen können, normale Spleißkomplexe ausbilden, wurden sowohl Analysen mit Glycerin-Gradienten-Zentrifugation von Spleißansätzen (Abb. 18), als auch mit nicht-denaturierender Gelelektrophorese (Abb. 19) durchgeführt.

Mit beiden Methoden konnte die Ausbildung von Spleißkomplexen mit einem Transkript, das noch vollständig gespleißt werden kann (tsp 19), einem, das nur noch den ersten Schritt der Reaktion absolvieren kann (tsp 5) und einem, an dem gar keine Reaktion mehr stattfindet (tsp 0), nachgewiesen werden, ohne irgendeinen erkennbaren Unterschied.

Die Bindung eines Transkripts durch den Spleißkomplex muß also nicht notwendigerweise in einer Spleißreaktion resultieren. Die Ergebnisse aller hier genannten Versuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

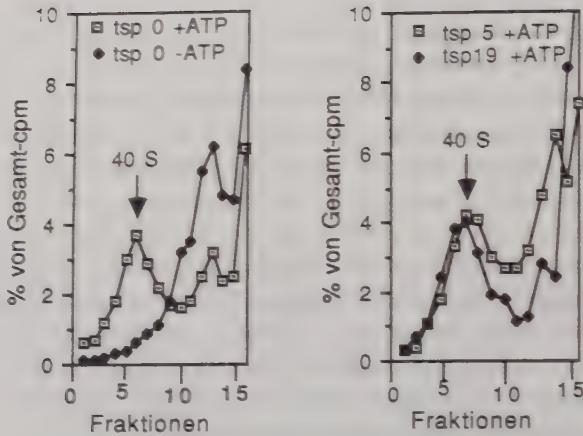


Abb. 18: Spleißkomplexausbildung von Transkripten mit verkürztem ersten Exon: Analyse durch Glycerin-Gradientenzentrifugation. Der Prozentanteil an der im gesamten Gradienten gemessenen Radioaktivität (cpm) pro Fraktion ist gegen die Fraktionen aufgetragen. Der 40 S-Gipfel - spezifisch für Spleißkomplexe - ist durch einen Pfeil markiert. Spleißansätze: mit und ohne ATP von tsp 0-Transkripten und mit ATP von tsp 5- und tsp 19-Transkripten.

Konstrukt	Länge des ersten Exons	Spleißkomplex- Ausbildung	Spleiß- Intermediate	Spleiß- Endprodukte
tsp 19	19 Nukl.	ja	ja	ja
tsp 12	12 Nukl.	ja	ja	ja
tsp 5	5 Nukl.	ja	ja	nein
tsp 3	3 Nukl.	ja	ja	nein
tsp 2	2 Nukl.	ja	ja	nein
tsp 1	1 Nukl.	ja	ja	nein
tsp 0	0 Nukl.	ja	nein	nein

Tabelle 2: Analyse der Exon 1-Mutanten, die durch gezielte Mutagenese gewonnen wurden: Für die Konstrukte tsp 0 bis 19 ist die Länge des ersten Exons angegeben und ausserdem aufgeführt, ob sie Spleißkomplexe ausbilden können, bzw. ob bei der Spleißreaktion Intermediate und Produkte auftreten.

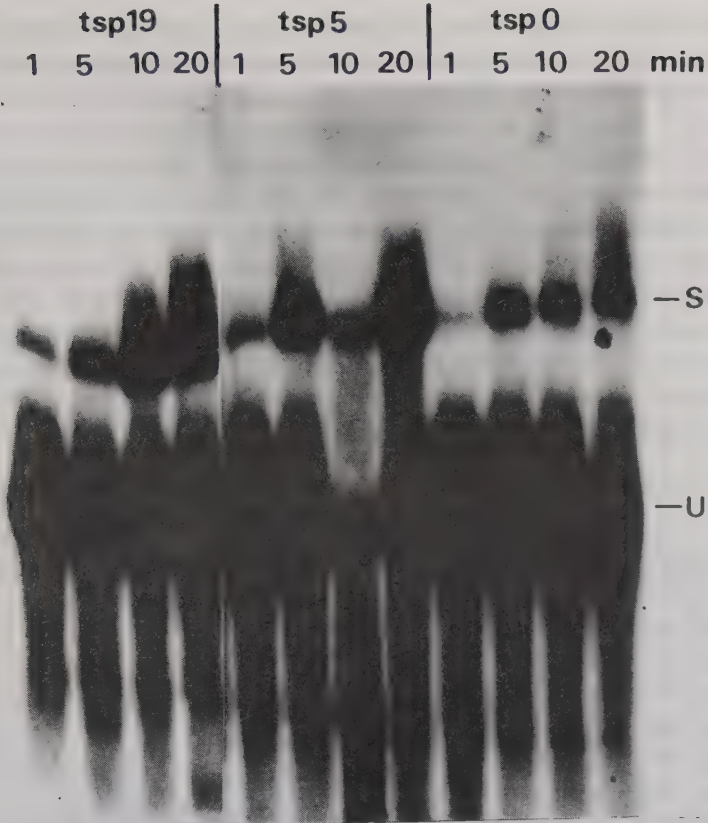


Abb. 19: Spleißkomplex-Analyse für die Transkripte tsp 19, tsp 5 und tsp 0 durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese in einem zusammengesetzten Gel (3% Polyacrylamid (160 : 1), 0,5 % Agarose). Probenentnahme bei der Spleißreaktion nach 1, 5, 10 und 20 Minuten. S = Spleißkomplex; U = unspezifischer Komplex.

2.2.3. Effekt einer Verkürzung des zweiten Exons auf das Spleißverhalten von Transkripten mit bereits verkürzttem Exon 1

Es war hier nicht das Ziel, die Wirkung von Exon 2-Verkürzungen auf das Spleißen generell zu untersuchen, da hierzu bereits Ergebnisse für Hefe vorlagen (*Rymond und Rosbash*, 1985): Danach können Deletionen sogar bis ins Intron hineinreichen, ohne daß

der erste Schritt der Reaktion beeinträchtigt würde. In der vorliegenden Untersuchung war es vielmehr von Interesse, ob sich das Spleißverhalten von Transkripten mit ohnehin schon verkürztem Exon 1 ändert, wenn zusätzlich noch das Exon 2 verkürzt wird.

Es wurde mit folgenden Transkripten gearbeitet: tsp 19, tsp 5 und tsp 3. Diese besaßen im ursprünglichen Fall ein zweites Exon von 169 Nukleotiden Länge, wenn der Transkriptionsvektor an der EcoRI-Schnittstelle im Polylinker nach dem Actin-Insert geschnitten worden war. Um verschiedene andere Längen des 2. Exons zu erhalten, wurden geeignete Schnittstellen für Restriktionsenzyme gesucht. Diese fanden sich in einer HpaII-Schnittstelle 47 Nukleotide nach dem Intron und in einer Fnu4HI-Schnittstelle 8 Nukleotide nach dem Intron. Die resultierenden Transkripte besaßen alle das Wildtyp-Intron von Hefe-Actin und zusätzlich verschiedenen Kombinationen von Exon-Längen, die in Tabelle 3 dargestellt sind.

	<u>verwendetes</u>	<u>Länge vom</u>	<u>Länge vom</u>	<u>1. Schritt d.</u>	<u>2. Schritt d.</u>
<u>Transkripte</u>	<u>Restriktionsenzym</u>	<u>1. Exon</u>	<u>2. Exon</u>	<u>Reaktion</u>	<u>Reaktion</u>
tsp 19/E	EcoRI	19	169	+	+
tsp 19/H	HpaII	19	47	+	+
tsp 19/F	Fnu4HI	19	8	+	+
tsp 5/E	EcoRI	5	169	+	-
tsp 5/H	HpaII	5	47	+	-
tsp 5/F	Fnu4HI	5	8	+	-
tsp 3/E	EcoRI	3	169	+	-
tsp 3/H	HpaII	3	47	+	-
tsp 3/F	Fnu4HI	3	8	+	-

Tabelle 3: Wirkung einer Exon 2-Verkürzung auf das Spleißverhalten von Exon 1-Mutanten: Für die verwendeten Transkripte sind die Restriktionsschnittstellen angegeben, an denen die SP6-Konstrukte vor der Transkription linearisiert worden waren, und die daraus resultierenden Exon-Längen. Ausserdem ist aufgeführt, ob der erste und zweite Schritt der Spleißreaktion durchlaufen werden.

In den Abbildungen 20 und 21 a, b sind die Ergebnisse der *In vitro*-Spleißreaktionen mit diesen Transkripten nach Auftrennung auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (8 %) zu sehen. Ob in den Fällen tsp 19/E und tsp 19/H noch beide Schritte der Reaktion stattfinden konnten, wurde aus dem Vorhandensein eines freien Introns in Lassoform geschlossen, da die reife mRNA wegen ihrer Kürze nicht zu sehen ist. Da bei tsp 19/F Intron und 2/3-Molekül zu eng beieinander liefen bei dieser Auftrennung, wurden die Banden für

verzweigte Moleküle, also 2/3-Molekül und Intron, für tsp 19/H und tsp 19/F aus dem Gel eluiert und nochmals auf einem anderen denaturierenden Polyacrylamidgel (5 %) weiter aufgetrennt. Danach ließen sich bei tsp 19/F eindeutig das 2/3-Molekül (317 Nukleotide) und das Intron (309 Nukleotide) voneinander unterscheiden. Nach der Stärke der tsp 19/F-Intron-Bande zu schließen, schien hier die Spleißreaktion den zweiten Schritt besonders effizient zu durchlaufen. Das bedeutet, daß ein Transkript mit Exonlängen von nur 19 Nukleotiden (Exon 1) und 8 Nukleotiden (Exon 2) ein geeignetes Substrat war für die Spleißreaktion. Ein Nachweis der 27-Nukleotide-langen reifen mRNA wurde hier nicht geführt.

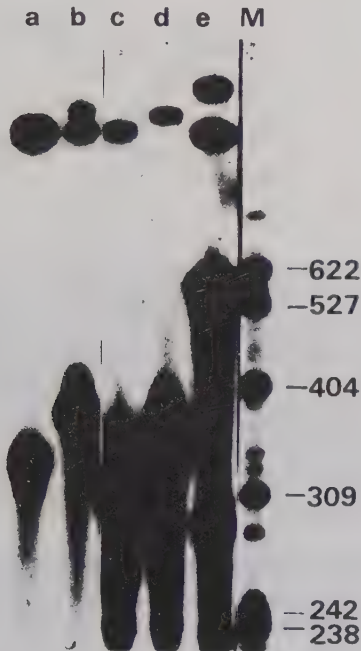


Abb. 20: Auswirkung von Exon2-Verkürzungen auf das Spleißverhalten von Transkripten mit bereits verkürztem Exon 1. Analyse durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Transkripte: a) tsp19/F (Exon 1: 19 Nukleotide, Exon 2: 8 Nukleotide); b) tsp19/H (Exon 1: 19 Nukleotide, Exon 2: 47 Nukleotide); c) tsp3/F (Exon 1: 3 Nukleotide, Exon 2: 8 Nukleotide); d) tsp3/H (Exon 1: 3 Nukleotide, Exon 2: 47 Nukleotide); e) SPact64-Kontrolle. M = pBR322, mit HpaII geschnitten.

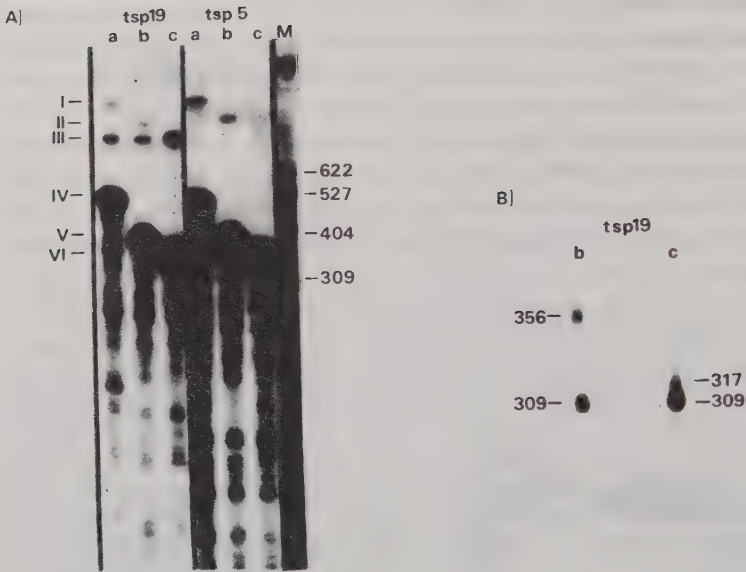


Abb.21: Auswirkung von Exon2-Verkürzungen auf das Spleißverhalten von Transkripten mit bereits verkürztem Exon 1.

A) Analyse durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Verwendete Transkripte: tsp 19 (Exon 1 von 19 Nukleotiden) mit Exon 2-Längen von 169 (a = tsp19/E), 47 (b = tsp19/H) und 8 Nukleotiden (c = tsp19/F); analog dazu tsp 5 (Exon 1 von 5 Nukleotiden Länge) mit den drei für tsp 19 genannten Exon 2-Längen (a = tsp5/E, b = tsp5/H, c = tsp5/F). Folgende RNA-Spezies konnten identifiziert werden: I = 2/3-Moleküle von tsp19/E und tsp5/E; II = 2/3- Moleküle von tsp19/H und tsp5/H; III = Introns von tsp 19/E, tsp19/H und tsp19/F, sowie 2/3-Moleküle von tsp19/F und tsp5/F; IV = Vorläufer-RNAs von tsp19/E und tsp5/E; V = Vorläufer-RNAs von tsp19/H und tsp5/H; VI = Vorläufer-RNAs von tsp19/F und tsp5/F.

B) Auftrennung der verzweigten RNA-Spezies II und III nach Elution aus den Gelspuren tsp19 b und c von Abb. 21 A in einem denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel. Die Positionen für die Introns (309 Nukleotide) und das 2/3-Molekül von tsp19/H (356 Nukleotide), sowie von tsp19/F (317 Nukleotide) sind angegeben.

Bei den tsp 5- und tsp 3-Transkripten, die ohnehin, auch bei einer Exon 2-Länge von 169 Nukleotiden nur noch den ersten Schritt der Reaktion durchlaufen konnten, führte eine Reduktion der Länge des zweiten Exons zu keiner diesbezüglichen Veränderung.

In Abb. 22 sind Glyceringradienten für die drei tsp 19-Formen dargestellt: tsp 19/E,

tsp19/H und tsp 19/F. In allen drei Fällen wurde Spleißkomplex-Ausbildung beobachtet, was auch zu erwarten war.

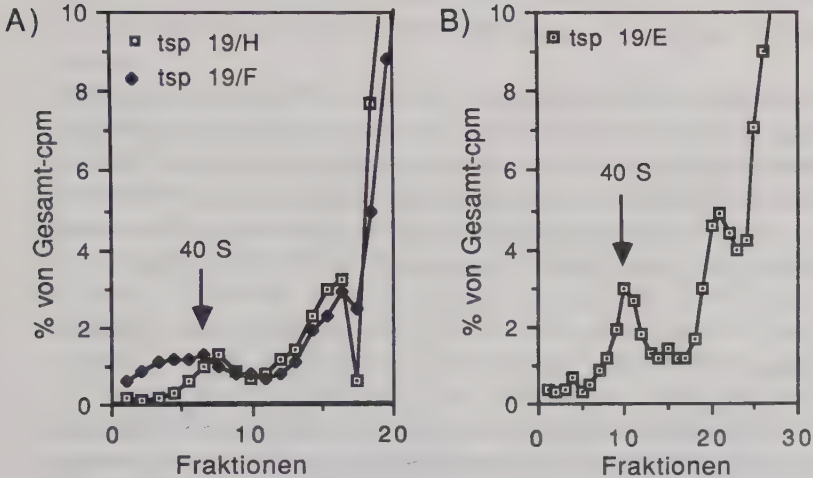


Abb. 22: Spleißkomplexbildung von Transkripten mit verkürzten Exons 1 und 2. Analyse durch Glycerin-Gradientenzentrifugation. Aufgetragen ist der Prozentanteil von der im gesamten Gradienten gemessenen Radioaktivität (cpm) in den einzelnen Fraktionen gegen die Fraktionen. Der 40 S-Gipfel - spezifisch für Spleißkomplexe - ist durch einen Pfeil markiert. Es wurden drei Spleißansätze mit ATP von folgenden Transkripten analysiert: A) tsp19/H und tsp19/F; B) tsp19/E.

2.3. Auswirkung der Struktur des 5'-Endes einer Prä-mRNA auf die Spleißreaktion

Konarska et al. (1984) haben gezeigt, daß mRNA-Vorläufermoleküle nur dann in HeLa-Zellextrakten effizient gespleißt werden, wenn sie am 5'-Ende eine cap-Struktur tragen. Ausserdem konnte dort die Spleißreaktion durch Zugabe von weniger als 10 µM cap-Analog (m7GpppG oder m7GTP) vollständig inhibiert werden, jedoch nur, wenn die Zugabe ganz am Anfang der Inkubation oder sogar schon vorher (Präinkubation des Extrakts ohne Transkript, aber mit cap-Analog) erfolgte.

2.3.1. Untersuchungen am Standard-Transkript von SPact64

Um nachzuprüfen, ob gleiche oder ähnliche Verhältnisse auch für die Hefe gelten, wurden in vorliegender Arbeit vergleichbare Experimente im *Saccharomyces cerevisiae*-System durchgeführt. Zunächst wurden vier verschiedene Ausgangs-Transkripte hergestellt:

I) + **cap**: Durch normale SP6-Transkription (Melton *et al.*, 1984), bei der das cap-Analog m⁷GpppG in vierfachem Überschuß (2 mM) zur Konzentration von GTP (500 µM) in der Reaktion eingesetzt wurde, erhielt man das Standard-Transkript mit cap am 5'-Ende und mit optimaler Spleißeffizienz. Contreras *et al.*, 1982, und Konarska *et al.*, 1984, konnten zeigen, daß die SP6-Polymerase bevorzugt die Transkription mit cap-Dinukleotiden initiiert. Die so transkribierten Prä-mRNAs begannen fast ausschließlich mit cap.

II) - **cap**: Ließ man m⁷GpppG bei der *In vitro*-Transkription weg, fingen die resultierenden RNAs mit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende (Konarska *et al.*, 1984) an.

III) **TAP**: Sollte das Vorläufer-RNA-Molekül nur eine Phosphatgruppe am 5'-Ende tragen, so behandelte man das bereits vorliegende Transkript mit der Triphosphat-Gruppe am Anfang (- cap) mit dem Enzym "Tobacco Acid Pyrophosphatase", kurz TAP. Dieses Enzym ist in der Lage, eine Diphosphat-Gruppe abzuspalten, so daß demzufolge nur noch eine einzige Phosphatgruppe am 5'-Ende der RNA übrig blieb. Ein Monophosphat-5'-Ende ist kein Substrat für die "capping"-Aktivität, kann also nicht nachträglich noch mit einer cap-Struktur versehen werden, falls eine solche Aktivität im Spleißextrakt vorhanden wäre.

IV) **RNase H**: Um ein Transkript zu erhalten, daß mit einer OH-Gruppe am 5'-Ende begann, wählte man folgenden Weg, der die weitestgehende Veränderung gegenüber dem Standard-Transkript darstellte: Für diese Modifikation, diente als Ausgangs-RNA das fertige Transkript mit der Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende. Benötigt wurde dazu ausserdem das Oligodeoxynukleotid HD 22 (siehe 2.2.1., Abb. 13). Dieses hybridisiert unter geeigneten Bedingungen an eine Region im Actin-Transkript, die im ersten Exon 50 bis 63 Nukleotide 5' vom Beginn des Introns entfernt liegt. Nach Anhybridisieren des Oligodeoxynukleotids an die RNA ließ man einen RNaseH-Verdau folgen: Dieses Enzym erkennt DNA/RNA-Hybride und hydrolysiert die RNA darin unter Bildung von 3'-Phosphat- und 5'-OH-Enden. Aus dieser Prozedur resultierte eine RNA, die insoweit vom Ausgangstranskript abwich, als sie ein verkürztes Exon 2 mit nur ca. 50 Nukleotiden Länge und eine OH-Gruppe an ihrem 5'-Ende aufwies. Auch dieses Transkript kann nachträglich nicht *in vitro* noch mit einer cap-Struktur am 5'-Ende versehen werden.

Analog zur Arbeit von *Konarska et al., 1984*, wurden mit jedem der vier unter a) beschriebenen Konstrukte vier Parallelversuche durchgeführt:

- 1: Der erste Ansatz entsprach jeweils den Standardbedingungen und wurde für 30 min bei RT inkubiert.
- 2: Der zweite Ansatz entsprach dem ersten in allen Punkten und enthielt zusätzlich noch 10 μM m7GpppG = cap-Analog.
- 3: Im dritten Fall wurde der Spleißextrakt zusammen mit dem Spleißpuffer vor Zugabe des Transkripts 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Prä-mRNA zugegeben und die Reaktion unter Standardbedingungen 30 min bei RT inkubiert..
- 4: Hier kombinierte man 2. und 3., indem man eine Vorinkubation des Spleißextrakts in Gegenwart von Spleißpuffer und 10 μM m7GpppG durchführte, an die sich die normale Reaktion mit Transkript anschloß.

Wie in Abb. 23 zu sehen ist, gab es zwischen den vier verschiedenen Versuchsansätzen für jedes gegebene Transkript keine signifikanten Unterschiede in der Spleißeffizienz; alle Transkripte wurden gleich gut gespleißt. Auch wenn man die vier Transkripte - +cap, -cap, TAP, RNase H - miteinander verglich, konnte man primär nur Unterschiede in der Stabilität der Konstrukte im Extrakt erkennen, keine in der Spleißeffizienz: Das Transkript mit der cap-Struktur am 5'-Ende (+cap) war bei weitem am stabilsten, daher ist hier die Bande für reife mRNA auch sehr ausgeprägt. Das Transkript, das nur mit einer OH-Gruppe begann, (RNase H) wurde während der Inkubation offensichtlich stark abgebaut. Daher sind hier auch die Banden für spleißspezifische Zwischen- und Endprodukte der Reaktion nur undeutlich zu sehen. Eine Mittelstellung nahmen die beiden Prä-mRNAs ein, die eine (TAP) oder drei Phosphat-Gruppen (-cap) am 5'-Ende trugen: Auch sie wurden im Vergleich zum ersten Transkript (+ cap) stärker abgebaut, aber weit weniger als das letzte Konstrukt (RNase H).

Beim Vergleich der Banden für reife mRNA und für Vorläufer-RNA miteinander läßt sich aber für alle dargestellten Fälle ein ungefähr gleiches Verhältnis der beiden Moleküle zueinander abschätzen, was auf eine ähnliche Spleißeffizienz schließen läßt. Die *In vitro*-Hefe-Spleißreaktion ist also unabhängig von der Struktur, die das verwendete *In vitro*-Transkript am 5'-Ende besitzt. Ausserdem hat die Zugabe von cap-Analog, m7GpppG, zum Reaktionsansatz zu Beginn der Inkubation des Trankripts oder bereits vorher durch Präinkubation des Extrakts keinen Einfluß auf das Spleißverhalten: Die Reaktionen werden dadurch nicht inhibiert.

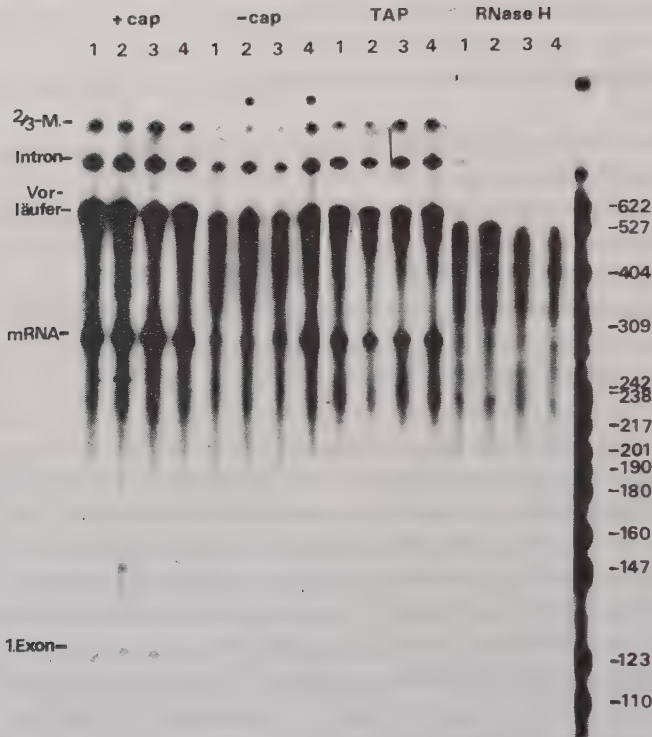


Abb. 23: Auswirkung der Struktur des 5'-Endes von Vorläufer-mRNAs auf ihr Spleißverhalten. Analyse der Reaktionen durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Folgende Varianten des SPact64-Transkripts wurden verwendet: **+cap:** 5'-cap-Struktur; **-cap:** 5'-Triphosphat-Gruppe; **TAP:** 5'-Monophosphat-Gruppe (nach Behandlung von **-cap** mit Pyrophosphatase); **RNase H:** 5'-OH-Gruppe, zusätzlich verkürztes Exon 1 von 50 Nukleotiden Länge (nach RNaseH-Verdau). Reaktionsdurchführung: 1: Standardinkubation; 2: Standardinkubation in Gegenwart von 10 μ M cap-Analog; 3: 15-minütige Präinkubation des Spleißextrakts ohne Transkript auf Eis, dann Standardreaktion; 4: 15-minütige Präinkubation des Spleißextrakts ohne Transkript in Gegenwart von 10 μ M cap-Analog auf Eis, dann Standardreaktion. Als Marker dient pBR322, mit HpaII geschnitten.

2.3.2. Untersuchungen an Exon 1-Mutanten

Bei diesen Versuchen wurde das Spleißverhalten der Exon 1-Mutanten aus 2.2.2. noch einmal daraufhin überprüft, ob sich die Ergebnisse, die zuvor an Transkripten erzielt worden waren, die eine cap-Struktur oder Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende trugen, auch mit Transkripten wiederholen ließen, die mit einer OH-Gruppe anfangen.

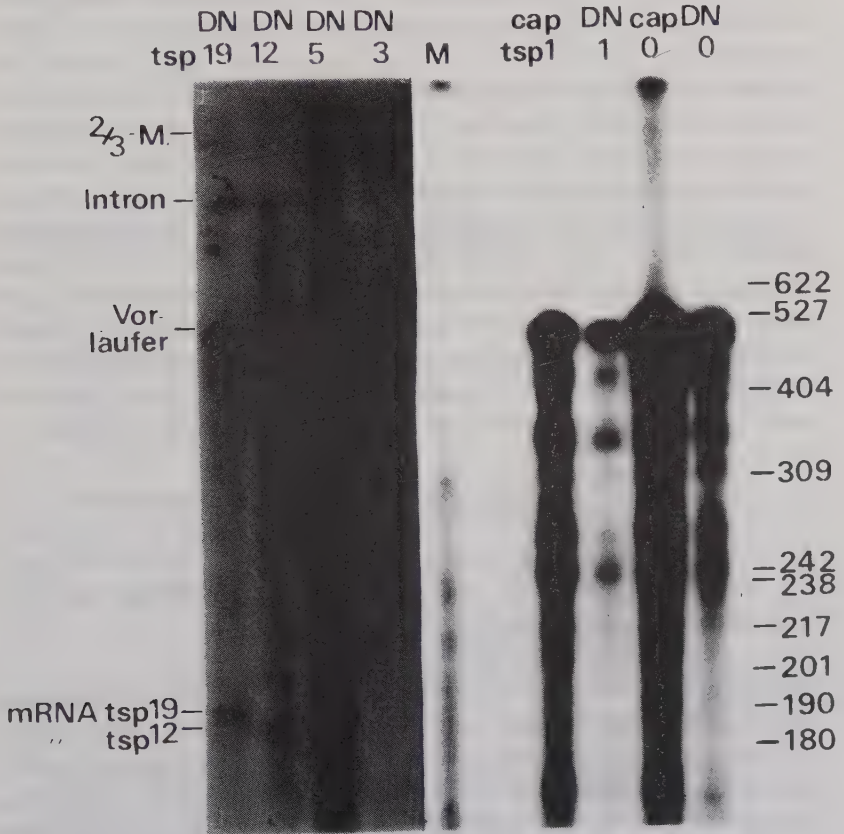


Abb. 24: Einfluß einer 5'-OH-Gruppe auf das Spleißverhalten von Transkripten mit verkürztem Exon 1. Analyse der Spleißreaktionen durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 8%igen Polyacrylamidgel. Die Transkripte tsp 19, tsp 12, tsp 5, tsp 3, tsp 1 und tsp 0 wurden untersucht. DN: Initiation der Transkription mit einem Dinukleotid, das resultierende Transkript trägt daher eine 5'-OH-Gruppe; cap: Kontrolle mit normaler 5'-cap-Struktur. M = pBR322, mit HpaII geschnitten.

Die SP6-Transkription wurde so durchgeführt, daß sie zunächst für 10 min nur in Gegenwart eines Dinukleotids (HO-5'-NpN-), das den beiden Startnukleotiden des jeweils gewünschten Transkripts entsprach, sowie den Nukleotiden, die nicht in diesem Dinukleotid enthalten waren, inkubiert wurde. Das hatte zur Folge, daß die Transkription zunächst mit diesem Dinukleotid initiiert wurde. Dann gab man die restlichen Nukleotide dazu und inkubierte den Reaktionsansatz wie üblich. Das resultierende Transkript fing mit dem Dinukleotid an und trug deshalb am 5'-Ende eine OH-Gruppe (Konarska *et al.*, 1984).

Folgende Transkripte wurden auf diese Weise hergestellt: tsp 19, 12, 5, 3, 1 und 0, jeweils mit einem synthetischen Dinukleotid (DN) als Start-Sequenz. In Abb.24 sind die Ergebnisse aus Spleißversuchen mit diesen Konstrukten dargestellt. Für tsp 1 und 0 wurde daneben das jeweilige Pendant mit cap am 5'-Ende aufgetragen, da bei diesen ein Effekt am ehesten erwartet wurde. Wie jedoch zu sehen ist, machte es für das Spleißverhalten dieser beiden Prä-mRNAs keinen Unterschied, ob sie mit cap oder mit einer OH-Gruppe anfangen: tsp 1 durchlief den ersten Schritt der Reaktion noch, aber sehr schlecht, tsp 0 wurde überhaupt nicht mehr prozessiert. Auch die anderen untersuchten Transkripte zeigten ein Verhalten vergleichbar mit den Ergebnissen, die zuvor mit den cap-tragenden Varianten erzielt worden waren: tsp 19 und 12 durchliefen beide Schritte des Spleißprozesses, tsp 5 und 3 den ersten davon, auch wenn sie am 5'-Ende nur eine OH-Gruppe (DN) trugen.

2.4. Untersuchungen zum Einfluß der Transkription auf Spleißen und Polyadenylierung und zur gegenseitigen Beeinflussung von Prä-mRNA-Prozessierungsschritten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob die Prä-mRNA-Prozessierungsschritte Polyadenylierung und Spleißen von der Transkription durch RNA-Polymerase II abhängen, und ob der Spleißvorgang an "capping" und Polyadenylierung gekoppelt ist, die ihm *in vivo* vorausgehen. Das Ziel der folgenden *In vivo*-Experimente war es, das Spleißverhalten von Prä-mRNAs zu untersuchen, die von RNA-Polymerase I und nicht, wie normalerweise, von RNA-Polymerase II transkribiert worden waren. Die natürliche Vorlage der RNA-Polymerase I sind die Gene für die 37S ribosomale Prä-RNA. Diese trägt kein cap am 5'-Ende. Mit diesen Versuchen erwartete man sich erstens eine Überprüfung der *in vitro* erzielten Ergebnisse zur cap-Abhängigkeit von Spleißreaktionen und zweitens Aufschluß darüber, ob Transkription einerseits und Polyadenylierung und Spleißen andererseits miteinander gekoppelt sind. Um diese Versuche durchführen zu

können, mußten Hefen mit geeigneten Plasmiden transformiert werden, die protein-kodierende Gene mit vorgeschaltetem RNA-Polymerase I-Promotor trugen.

2.4.1. Herstellung der Konstrukte

Die ribosomalen Transkriptionseinheiten liegen bei Hefe auf dem Chromosom VII mit ca. 120 Kopien in Tandem-Anordnung vor. Sie sind schematisch in Abb.25 (nach Warner, 1982) dargestellt.

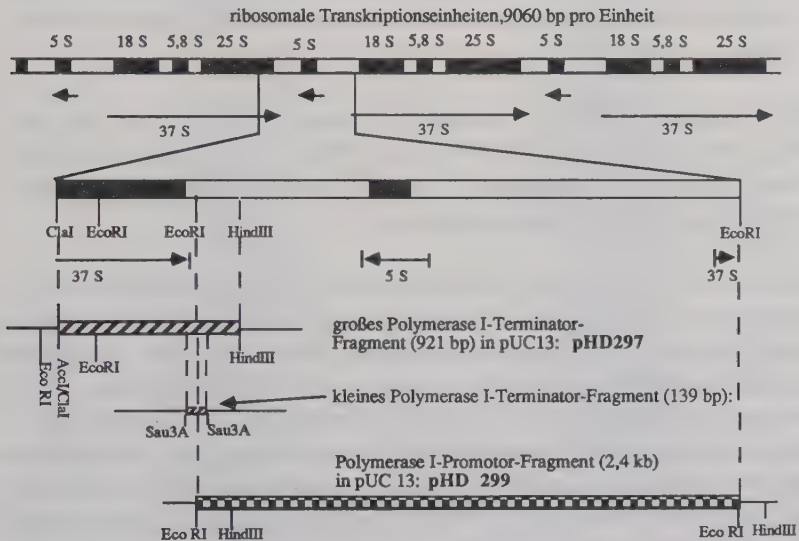


Abb. 25: Schematische Darstellung der ribosomalen Transkriptionseinheiten von Hefe. Die kodierenden Bereiche für die 18 S, 5,8 S und 25 S rRNAs (schwarze Balken) und für die 5 S rRNA (grauer Balken) sind angegeben, ebenso die Bereiche für das 37 S Primärtranskript (langer Pfeil), das durch RNA-Polymerase I abgelesen wird, und für das 5 S Transkript (kurzer Pfeil), das von RNA-Polymerase III transkribiert wird. In einem größeren Ausschnitt ist der Bereich mit den relevanten Restriktionsstellen dargestellt, aus dem das große ClaI-HindIII-Terminator-Fragment (921 bp) und das EcoRI-Promotor-Fragment (2,4 kb) durch Restriktionsspaltungen von Hefe-Gesamt-DNA gewonnen wurden, die jeweils in pUC13 gesetzt wurden, wodurch die Konstrukte pHD297 und pHD299 resultierten. Die Position des kleinen Sau3A-Terminator-Fragments (139 bp) auf pHD297 ist durch einen Pfeil angegeben.

Die drei rRNAs 18S, 5,8S und 25S werden zunächst als ein großes Primärtranskript (37S) von RNA-Polymerase I transkribiert und entstehen dann durch verschiedene Prozessierungsschritte. Die 5S-rRNA wird von RNA-Polymerase III in die andere Richtung abgelesen. Der gesamte RNA-Polymerase I-Promotor liegt auf einem 2,4kb EcoRI-Fragment (siehe auch Abb. 25), das v. a. den sog. "Nicht- transkribierten-Spacer" (NTS) umfaßt. Dieser liegt zwischen den für die 37S rRNA kodierenden Genabschnitten. Die letzten 43 Nukleotide des 2,4 kb EcoRI-Fragments gehören bereits zum transkribierten Bereich. Am anderen Ende dieses Fragments (distal vom 5'-Ende der 37S rRNA) befindet sich ein ca. 200 bp umfassender Teil, der als "Enhancer", also transkriptions-steigerndes Element, bezeichnet wird und der für die Transkription sowohl hinsichtlich der Effizienz (Transkriptionsausbeute) als auch hinsichtlich der Spezifität (korrekte Initiierung der RNA) wichtig ist.

Das 3'-Ende der 37S rRNA liegt auf einem 139 bp langen Sau3A-Fragment, das 8 bp in das EcoRI-Promotor-Fragment hineinragt. Die Terminations-Region für Polymerase I-Transkription liegt also unmittelbar vor der "Enhancer"-Region für die jeweils darauffolgende ribosomale Transkriptionseinheit.

Zunächst sollte ein Fragment, das den gesamten RNA-Polymerase I-Promotor trug, kloniert werden: Gesamt-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm DBY 747) wurde mit EcoRI gespalten und auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt. Da die ribosomalen Transkriptionseinheiten repetitiv sind und in ca. 120 Kopien vorkommen, sind die entsprechenden Banden besonders deutlich zu erkennen. Eine dieser deutlich aus dem übrigen Hintergrund hervorstechenden Banden, deren Größe anhand des Längenstandards aus 2,4 kb geschätzt werden konnte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, und die darin enthaltenen DNA-Fragmente elektroeluiert und in die EcoRI-Stelle eines pUC13-Vektors eingesetzt. Damit wurde *E.coli*, JM109, transformiert. Durch analytische Restriktions-spaltungen und DNA-Sequenzierung (Abb.26) wurde ein Klon ermittelt, der das richtige Fragment im Plasmid enthielt und zwar in der Orientierung, daß eine RNA, deren Transkription am Polymerase I-Promotor beginnen würde, in den Polylinker hinein gelesen werden müßte. Das so erhaltene Plasmid wurde HD 299 genannt.

HD 299

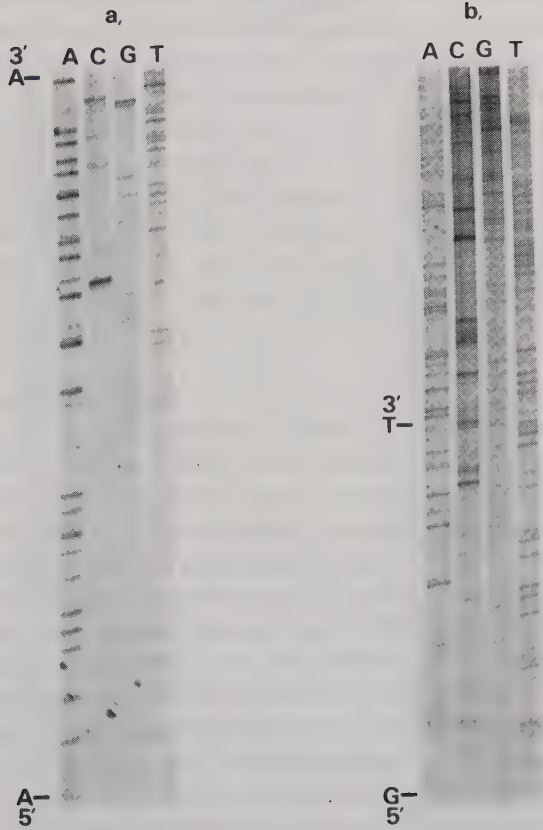


Abb. 26: Plasmidsequenzierung von pH299 durch Kettenabbruch-Verfahren nach *Sanger et al. (1977)*. Ansequenzieren der beiden Enden des RNA-PolymeraseI-Promotorfragments (EcoRI). Anfangs- und Endnukleotide der im folgenden aufgeführten Sequenz sind jeweils angegeben. a) Ermittelte Sequenz nach Sequenzierung mit Vorwärtsprimer: 5'-AAAAACATGTATTGTATATATCTATTATAATATACGATGAGGATGATAGTGTGTAAGAGTGAACATTTACTAATGTATGTAAGTTACTATTTACTATTTGGTCTTTTTA-3', b) Ermittelte Sequenz nach Sequenzierung mit Rückwärtsprimer: 5'-GAATTCGTTTCCAAACCTCTTTTCGAACCTGTCTTCAACTGCTTTCGTATGAAGTACCTCCCAACTACTTTT-3'

HD 297

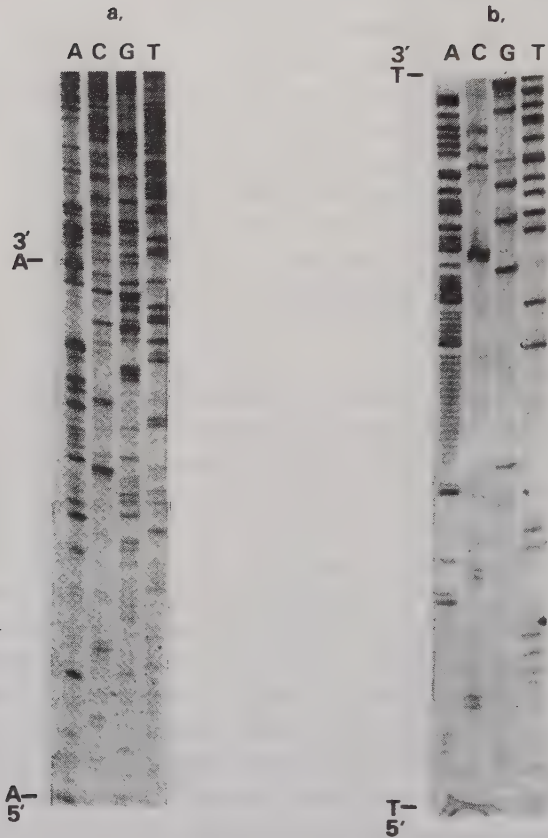


Abb. 27: Plasmidsequenzierung von pH297 durch Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger et al. (1977). Ansequenzierung der beiden Enden des großen RNA-Polymerase I-Terminator-Fragments (ClaI-HindIII). Anfangs- und Endnukleotide der im folgenden aufgeführten Sequenzen sind jeweils angegeben. Ermittelte Sequenz nach Sequenzierung mit Vorwärtsprimer: 5'-AGAGTCGATCCCTTAGTCCCTCGGAATTTGAGGCTAGAGGTGCCA GAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTGGCAGTCAA-3'. b) Ermittelte Sequenz nach Sequenzierung mit dem Rückwärtsprimer: 5'-TTTGTGAAAGCCCTTCTCTTTCAACCCATCTTTGCAACG(A)₁₆T(A)₆T(A)₅ GACCAAATAGTAAATAGTAACTTACATACATTAGTAAATGGT-3'.

Um den RNA-Polymerase-Terminator zu erhalten, mußte zunächst ein größeres Fragment aus dem 3'-terminalen Bereich der 37 S-rRNA und des anschließenden NTS in pUC13 kloniert werden (siehe auch Abb. 25). Hefe-Gesamt-DNA wurde mit ClaI und HindIII geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus den wiederum deutlich erkennbaren rRNA-spezifischen Banden wurde eine mit der Größe von ca. 920 bp ausgeschnitten. Ein passendes ClaI-HindIII-Fragment von 921 bp Länge aus den ribosomalen Transkriptionseinheiten umfaßt 636 bp vom 3'-Ende der 37S rRNA und 285 bp aus dem daran anschließenden NTS. Auf diesem Fragment ist das oben erwähnte Sau3A-Terminator-Fragment von 139 bp Länge enthalten. ClaI-HindIII-DNA-Fragmente der richtigen Größe wurden in die AccI-HindIII-Restriktionsschnittstellen von pUC13 eingesetzt und in JM109 kloniert. Das richtige Fragment wurde durch DNA-Sequenzierung (Abb.27) ermittelt und das so erhaltene Plasmid HD 297 genannt.

Als nächstes folgte nun die Konstruktion der protein-kodierenden Gene, die normalerweise von RNA-Polymerase II transkribiert werden, in Kombination mit einem RNA-Polymerase I-Promotor. Als erstes wurden dazu zwei verschiedene Actin-Fragmente verwendet: Das eine ist das bereits erwähnte Alu I-Fragment (siehe 2.2.1.), das das komplette Actin-Intron, sowie Teile der beiden Exons trägt und zwar 71 Nukleotide vom Exon 1 und 162 Nukleotide vom Exon 2. Dieses Fragment war bereits zu einem früheren Zeitpunkt für eine andere Konstruktion (pBA3, siehe *Domdey et al.*, 1984) mit HindIII-Linkern versehen worden. Das resultierende HindIII-Fragment nun wurde in die HindIII-Restriktionsschnittstelle von pUC13 ligiert und zwar in der Orientierung, daß das erste Exon benachbart zum übrigen Polylinker zu liegen kam (AL 101). Ebenfalls schon zu einem früheren Zeitpunkt war an diesem Fragment eine gezielte Mutagenese vorgenommen worden, die das erste Exon auf 7 Nukleotide verkürzte. Es entstand dadurch ein HindIII-Fragment, daß mit Ausnahme des veränderten ersten Exons identisch mit dem oben erwähnten war. Auch dieses wurde in die HindIII-Restriktionsschnittstelle von pUC13 eingesetzt, in der gleichen Orientierung, wie das andere (AL 102). Sowohl vor AL 101, als auch vor AL 102 wurde nun das 2,4 kb EcoRI-Fragment aus HD 299 gesetzt, das den ribosomalen Promotor trägt, und zwar in der Orientierung, daß ein Transkript von diesem Promotor in Richtung der Actin-Gene abgelesen werden muß. Die resultierenden Konstrukte heißen AL201 und AL 202. Als Kontrolle für die Polymerase I-Konstrukte nun, wurde ein drittes Konstrukt vorbereitet, das den normalen Actin-Promotor, also einen Promotor für RNA-Polymerase II trägt. Um dies zu erreichen, wurde aus dem Konstrukt AL 101 ein EcoRI-XhoI-Fragment herausgeschnitten, wodurch restlicher Polylinker, das erste Exon und ein Teil des Introns herausfielen, und in diese Schnittstellen ein EcoRI-XhoI-Fragment aus einem Konstrukt mit dem kompletten Wildtyp-Actin-Gen

(HD100) eingesetzt. Auf diesem Fragment liegen der vollständige Actin-Promotor und das komplette erste Exon, sowie der entsprechende Teil des Introns, der bei AL 101 herausgenommen wurde. Das resultierende Plasmid stellt ein Pendant zu den Konstrukten AL 101 und AL 102 dar mit den gleichen Intron- und Exon 2-Sequenzen, jedoch mit dem kompletten ersten Exon von 150 Nukleotiden Länge und dem RNA-Polymerase II-Promotor (AL 203).

Hinter die Actin-Bereiche in den drei Konstrukten AL 201, AL 202 und AL 103 wurden nun in einem Schritt zwei Terminatoren gesetzt und zwar einer für RNA-Polymerase II und einer für RNA-Polymerase I. Diese hatte man folgendermaßen gewonnen: In den Hefe-Shuttle-Vektor pAAH5 (Ammerer, 1983), war bereits früher einmal das HindIII-Fragment, das auch für die Konstruktion von pAL 102 verwendet wurde, eingesetzt worden (pKV48). pAAH5 besitzt vor der HindIII-Schnittstelle den ADH-Promotor und danach den ADH-Terminator; beide können als HindIII-BamHI-Fragmente herausgeschnitten werden. In Fall von pKV48 war die HindIII-Restriktionsschnittstelle zwischen dem neu eingesetzten Actin-HindIII-Fragment und dem Terminatorfragment durch eine Punktmutation verschwunden, so daß der Actin-Bereich zusammen mit dem ADH-Terminator als ein HindIII-BamHI-Fragment herausgeschnitten und in pUC12 kloniert werden konnte (pAL 100). Das bereits früher erwähnte Sau3A-Fragment aus HD 297 von 139 bp Länge, das das Terminationssignal für die RNA-Polymerase I enthält, wurde nun in die BamHI-Restriktionsschnittstelle von diesem Konstrukt eingesetzt (pAL 200).

Als man nun von diesem Konstrukt pAL 200 ein AatII-XhoI-Fragment herauschnitt, damit also einen Teil des Vektors mit Polylinker-Sequenzen, das Exon 1 und einen Teil des Introns entfernte, und dort hinein ein jeweils entsprechendes AatII-XhoI-Fragment aus den Konstrukten pAL 201, pAL 202 und pAL 103 einsetzte, erhielt man drei Konstrukte, die in zwei Fällen den Polymerase I-Promotor mit darauffolgenden Actin-Exon 1-Sequenzen verschiedener Länge und einmal den Actin-Promotor mit dem Wildtyp-Exon 1 von Actin trugen und die ansonsten identisch waren: Anschließend an diese Bereiche folgten das Actin-Intron und ein Teil des zweiten Exons, ausserdem der ADH-Terminator für RNA-Polymerase II und schließlich der ribosomale Terminator. In diese drei Konstrukte (pAL 301, pAL 302 und pAL 303) wurde nun über die AatII-NarI-Restriktionsschnittstellen noch ein Fragment aus dem Hefe-Shuttle-Vektor YEp 351 eingebracht, daß die 2 μ -Sequenzen, sowie das Leu2-Gen enthielt, die zur Plasmid-Vermehrung in Hefe wichtig sind. Diese endgültigen Konstrukte wurden pAL 401, pAL 402 und pAL 403 genannt. Mit ihnen wurde Hefe transformiert, nachdem die aufgeführten

Klonierungsschritte alle in *E. coli* durchgeführt worden waren. Diese sind in Abb. 28 noch einmal schematisch dargestellt.

Zusätzlich zu diesen Actin-Konstrukten wurde ein weiteres konstruiert, bei dem nicht das Hefe-Actin-Gen, sondern das Hefe-MATa1-Gen (*Astell et al.*, 1981) mit RNA-Polymerase I-Promotor und -Terminator versehen wurde. Dazu wurden zunächst das Polymerase I-Promotor-Fragment, d. h. also das 2,4 kb EcoRI-Fragment aus HD299, und das große Polymerase I-Terminator-Fragment, also das ClaI-HindIII-Fragment von 921 bp Länge, das allerdings als BamHI-HindIII-Fragment aus HD 297 herausgeholt wurde, auf einem pUC13-Plasmid kombiniert. Das resultierende Plasmid mit Promotor- und Terminator-Fragment hintereinandergeschaltet wurde PIM-1 genannt. In die BamHI-Restriktionsschnittstelle konnte nun ein MATa1-Gen aus Hefe eingesetzt werden, das 45 Nukleotide vom Exon 1, komplettes Intron 1, komplettes Exon 2, komplettes Intron 2 und 19 Nukleotide von Exon 3 umfaßte. Es war dies ein RsaI-Sau3A-Fragment, dem an der RsaI-Schnittstelle ein BamHI-Linker angefügt worden war. Man konnte diesen Bereich also als BamHI-Sau3A-Fragment erhalten, das von K. Koehrer in diesem Labor zur Verfügung gestellt wurde, und nun in der richtigen Orientierung in die BamHI-Schnittstelle des Vektors PIM-1 einsetzen, woraus das Plasmid PIM-2 resultierte. Wie im Fall der Actin-Konstrukte wurden wiederum über die AatII--NarI-Schnittstellen die zur Plasmid-Vermehrung in Hefe notwendigen Sequenzen aus YEp351 in den Vektor eingebracht, der in dieser endgültigen Form PIMYEp genannt wurde. Die Klonierungsschritte, die wieder in *E. coli* durchgeführt wurden, sind in Abb. 29 schematisch dargestellt.

Die oben aufgeführten endgültigen Konstrukte sind Hefe-Shuttle-Vektoren: Sie können sowohl in *E. coli* weiter vermehrt werden, als auch in *Saccharomyces cerevisiae*. Für die Vermehrung und Selektion in *E. coli* besitzen sie einen "origin of replication" und das Ampicillin-Resistenzgen, für die Vermehrung und Selektion in Hefe die 2 μ -Sequenzen und das Leu2-Gen. Die 2 μ -Sequenzen stammen aus dem 2 μ -Plasmid, dem einzigen bekannten Plasmid aus Hefe, das in ca. 30 Kopien pro Zelle vorkommt und im Kern repliziert wird, wobei es allerdings nicht gleichmäßig an die Tochter-Zellen weitergegeben wird. Um zu gewährleisten, daß Hefe-Shuttle-Vektoren mit den 2 μ -Sequenzen nicht wieder verloren gehen, muß eine Selektion über das Leu2-Gen erfolgen. Dem Hefe-Stamm, der transformiert wurde, DBY746, fehlt im Genom dieses wichtige Gen für den Leucin-Stoffwechsel. Auf Nährmedium ohne Leucin können daher nur die Kolonien wachsen, denen auf dem Plasmid ein funktionelles Leu2-Gen zur Verfügung gestellt wird. Die Hefe-Transformation erfolgte mit der Alkali-Methode unter Verwendung von

Lithium-Acetat (Ito *et al.*, 1983). Nachdem man Kolonien erhalten hatte, die auf leucin-freiem Medium wachsen können, wurden für jeden Transformationsansatz jeweils zwei davon ausgewählt, um zu analysieren, ob sie wirklich das gewünschte Plasmid enthielten. Dies geschah durch Southern-Blot-Analyse. Von den verschiedenen Klonen wurde DNA präpariert, spezifisch gespalten - in diesem Fall mit EcoRI - und auf 1%igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die DNA-Fragmente konnten durch Southern-Blot auf Nitrozellulose-Filter transferiert und dort denaturiert und fixiert werden. Dort erfolgte die Hybridisierung mit speziellen Oligodeoxynukleotiden, die zu Fragmenten bekannter Größe aus den geschnittenen Vektoren, die sich hoffentlich in den Zellen befanden, komplementär sind. Verwendet wurden dazu das Oligodeoxynukleotid ST10, das an die ersten 20 Nukleotide des zweiten Actin-Exons hybridisieren kann, oder das Oligodeoxynukleotid KK5, das mit den Nukleotiden 8 bis 28 vom zweiten Exon aus MATa1 basenpaaren kann. In Abb. 30 ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse wiedergegeben. Die Länge der spezifisch hybridisierenden Banden, sowohl von Kontroll-Plasmiden als auch von DNA aus den Transformanden war identisch. Alle untersuchten Klone waren positiv, also mit dem richtigen Plasmid transformiert, nur in einem Fall (1) war die Kopienzahl so niedrig, daß dieser Klon nicht weiter verwendet wurde.

Abb. 28 (siehe S. 53 und 54): Klonierschema zur Herstellung der Konstrukte pAL 401, pAL 402 und pAL 403.

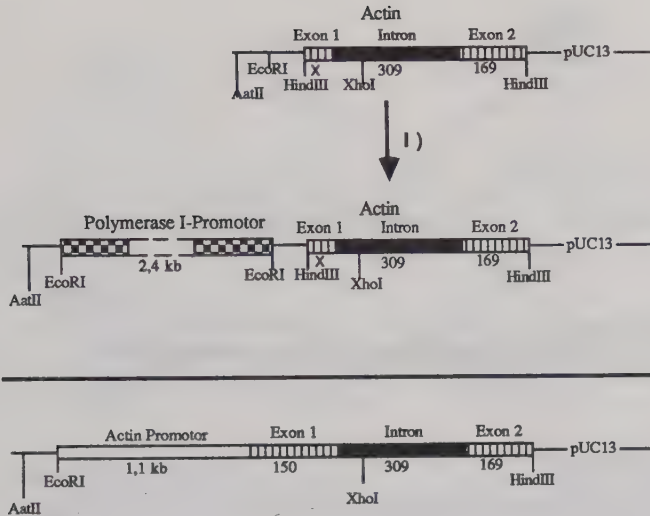
a) Konstruktion von pAL 201 und pAL 202 aus pAL 101 und pAL 102 durch Einsetzen des 2,4 kb EcoRI-Fragments mit dem RNA-Polymerase I-Promotor (Klonierungsschritt I); Darstellung des Kontroll-Konstrukts pAL 203 mit dem Original-Actin-Promotor.

b) Konstruktion von pAL 200 aus pAL 100 durch Einsetzen des 139 bp-Sau3A-Fragments mit dem RNA-Polymerase I-Terminator in die BamHI-Restriktionsschnittstelle (Reaktionsschritt II)

c) Kombination von pAL 201, pAL 202 und pAL 203 mit pAL 200 über die AatII-XhoI-Schnittstellen, woraus die Konstrukte pAL 301, pAL 302 und pAL 303 resultieren (Reaktionsschritt III), und anschließend Einsetzen des AatII-NarI-Fragments aus YEp351 mit den 2 μ -Sequenzen und dem Leu2-Gen in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen, woraus die endgültigen Konstrukte pAL 401, pAL 402 und pAL 403 entstehen. Die Zahlen unter den Exons und dem Intron von Actin geben die Länge der jeweiligen Bereiche in Basenpaaren an.

Abb. 28

a)

**Konstrukte:**

pAL 101
(Exon 1 = 71 N.)

+

pAL 102
(Exon 1 = 7 N.)

pAL 201

+

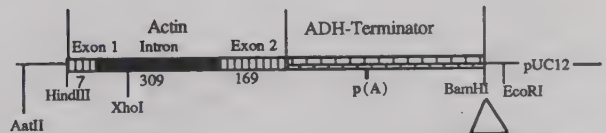
pAL 202

pAL 203

b)

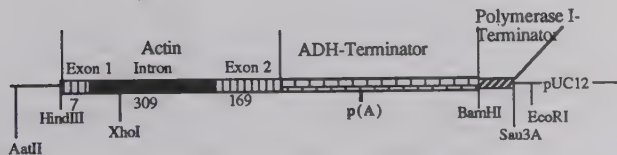
Konstrukte:

pAL 100



11)

pAL 200



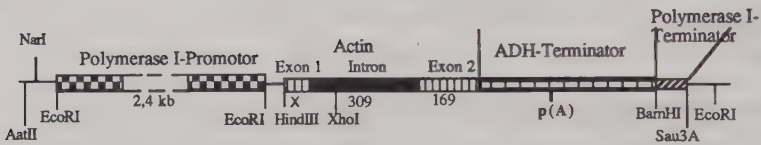
Sau3A Sau3A
(aus HD 297)

c)

pAL201
pAL202
pAL203

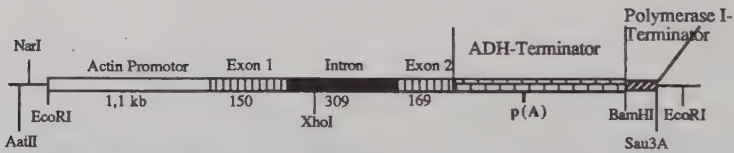
pAL200

III)



pAL301
+
pAL302

und



pAL303

YE p351

IV)

pAL401
pAL402
pAL403

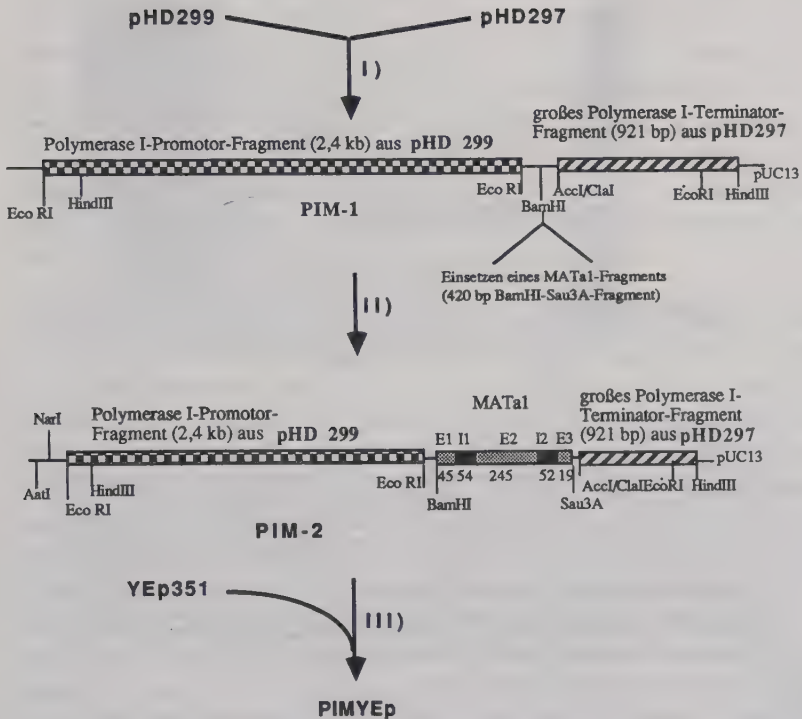


Abb. 30: Klonierschema zur Herstellung des Konstrukts PIMYEp: Das 2,4 kb-EcoRI-Fragment mit dem RNA-Polymerase I-Promotor und das 921 bp-ClaI-HindIII-Fragment mit dem RNA-Polymerase I-Terminator (großes Terminator-Fragment) werden auf einem pUC13-Plasmid kombiniert (Reaktionsschritt I), woraus PIM-1 entsteht. In die dazwischenliegende BamHI-Restriktionsschnittstelle wird ein 420 bp-BamHI-Sau3A-Fragment mit einem Teil des MATA1-Gens eingesetzt (Reaktionsschritt II), was das Konstrukt PIM-2 ergibt. Nach Einsetzen eines AatII-NarI-Fragments aus YEp351 mit den 2 μ -Sequenzen und dem Leu2-Gen aus Hefe (Reaktionsschritt III) ist der "Shuttle"-Vektor PIMYEp fertig. E = Exon, I = Intron. Die Zahlen unter den Exons und Introns von MATA1 geben die Länge der jeweiligen Bereiche in Basenpaaren an.

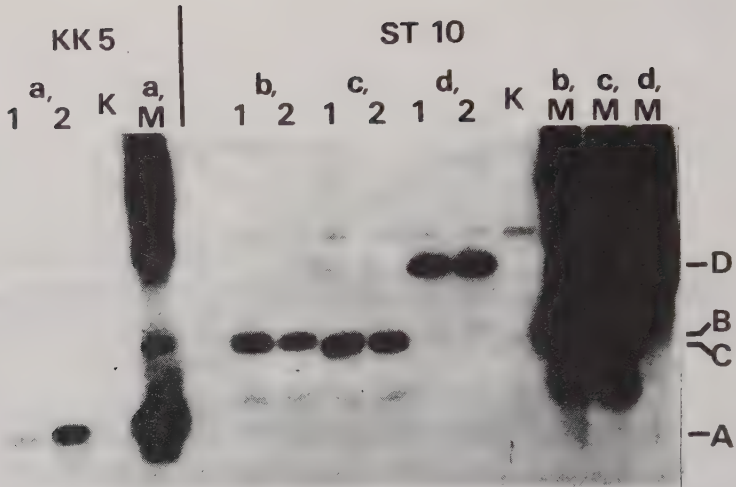


Abb. 30: Southern-Blot-Hybridisierung von Hefe-Gesamt-DNA, die mit EcoRI gespalten worden war. Sie wurde aus je 2 Klonen präpariert, die nach Transformation von DBY 746 mit den Konstrukten PIMYep (a), pAL 401 (b), pAL 402 (c), pAL 403 (d) und dem Kontroll-Plasmid YEp351 (K) erhalten wurden. Als Marker (M) dienen die zur Transformation verwendeten Plasmide, ebenfalls mit EcoRI gespalten. Zur Hybridisierung wurden die radioaktiv-markierten Oligodeoxynukleotide KK5 (für MATA1-spezifische Klone) und ST10 (für Actin-spezifische Klone) verwendet. Großbuchstaben geben die korrekten Positionen der Banden für die entsprechenden Klone (besitzen die korrespondierenden Kleinbuchstaben) an.

2.4.2. Analyse der *In vivo*-Spleißreaktion und -Spleißeffizienz der Actin-Konstrukte

Um Aussagen zum Spleißverhalten der Transkripte treffen zu können, die von den Actin-Konstrukten pAL401, pAL 402 und der Kontrolle pAL 403 abgelesen werden, führte man zunächst eine Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA durch. Die RNA wurde durch Extraktion von Hefezellen mit heißem Phenol bei pH 5,0 gewonnen. Ausser Hefeklonen, die mit den erwähnten Plasmiden transformiert worden waren, wurde auch

einer, der das nur das Kontrollplasmid YEp351 besaß, als Kontrolle herangezogen. Gesamt-RNA aus den Transformanden wurde in je 3 Parallelansätzen auf einem Glyoxalgel aufgetrennt. Anschließend folgte ein Northern Blot auf einen Nitrozellulose-Filter, der nach Fixierung der RNA durch UV-Bestrahlung in drei Streifen zerteilt wurde, von denen jeder die vier verschiedenen RNA-Spezies und einen DNA-Längenmarker (bereits radioaktiv markiert) trug. Diese wurden nun jeweils mit einem anderen, radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotid hybridisiert: Filter 1 mit ST 10, das zu Bereichen des 2. Exons von Actin komplementär ist, Filter 2 mit dem Oligo A 1, das spezifisch an reife, gespleißte Actin-mRNA hybridisiert (komplementär zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des 1. Exons von Actin und zu 9 Nukleotiden vom 5'-Ende des 2. Exon) und der dritte Filter schließlich mit A 2, das komplementär ist zu dem Bereich in AL401- und AL402-Transkripten, der aus der Polylinker-Region vor dem ersten Exon stammt, das aber nicht an AL403 hybridisieren kann (Abb.32).

Bei einer Hybridisierung mit ST 10 (Exon 2) sollten sowohl Vorläufer-RNA als auch reife mRNA auf dem Blot zu erkennen sein. Wie zu erwarten war, sieht man im Fall von AL403 (c), also der Polymerase II-Kontrolle, nur eine starke Bande, die dem reifen, gespleißten Produkt von 534 Nukleotiden Länge plus Poly(A)-Schwanz entspricht, keine Bande für Vorläufer-mRNA (843 Nukleotide). Hier beträgt die Spleißeffizienz praktisch 100 %. Bei AL401 und 402 erhält man nun nicht Transkripte von einer Länge, wie sie zu erwarten wäre, wenn die Transkription bis zum Polymerase I-Terminator durchgelaufen wäre (Länge des Vorläufer-Transkripts von AL 401 mit 1118 Nukleotiden, von AL 402 mit 1052 Nukleotiden, bei den reifen Profukten jeweils 309 Nukleotide kürzer), sondern deutlich kleinere Transkripte. Diese lassen sich nur erklären, wenn in beiden Fällen die RNA an den Polyadenylierungs-Stellen im ADH-Terminator-Fragment endete, bzw. prozessiert wurde, und dort polyadenyliert wurde. Die Länge der erwarteten RNA-Spezies beträgt dann ohne den Poly(A)-Schwanz bei AL 401 für das Vorläufer-Molekül 852 Nukleotide und die mRNA 543 Nukleotide und bei AL 402 für das Vorläufer-Molekül 786 Nukleotide und für die mRNA 477 Nukleotide (Abb.31). Die Polyadenylierung dieser Transkripte ließ sich in einem späteren Experiment bestätigen (siehe weiter unten und Abb. 33). Für den Fall AL 401 ist praktisch nur eine RNA von der Länge reifer, polyadenylierter und gespleißter mRNA zu sehen, wie bei AL 403, für den Fall AL 402 dagegen auch Vorläufer-RNA, was auf eine geringere Spleißeffizienz schließen läßt. Das Verhältnis von Vorläufer-RNA zu mRNA und damit die Spleißeffizienz konnten für AL 402 besser auf Filter 3 abgeschätzt werden. Der einzige Unterschied zwischen beiden von Polymerase I-Promotoren ausgehenden Transkripten besteht in der Länge der Original-Exon1-Sequenzen aus Actin. Diese beträgt bei AL 401 71 Nukleotide und bei AL 402 nur 7

Nukleotide, das ist natürlich noch nicht das ganze erste Exon in diesen Transkripten; davor liegen jeweils noch 94 Nukleotide, die nicht mit Actin-Sequenzen identisch sind (Abb. 31).

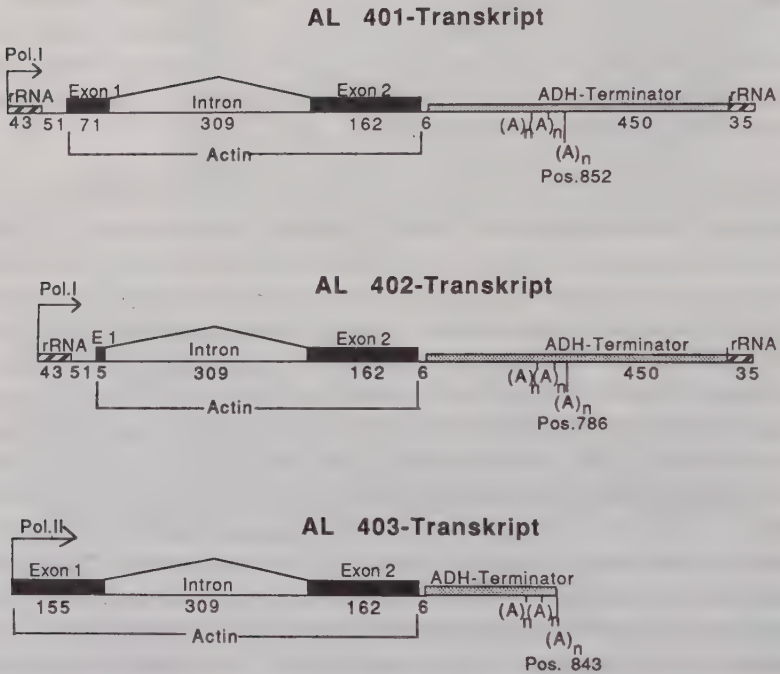


Abb. 31: Schematische Darstellung der Primär-RNAs, wie sie sich nach Transkription von den Transformationskonstrukten durch RNA-Polymerase I (Pol.I) - im Fall von pAL 401 und pAL 402 - oder durch RNA-Polymerase II (Pol.II) - im Fall von pAL 403 - darstellen müssten. Die Zahlen unter den jeweiligen Balken geben die Länge der entsprechenden Bereiche in Nukleotiden an. E = Exon, (A)_n = Polyadenylierungsstellen (für die hauptsächlich verwendete ist die Position (Pos.) im ADH-Terminator aufgeführt).

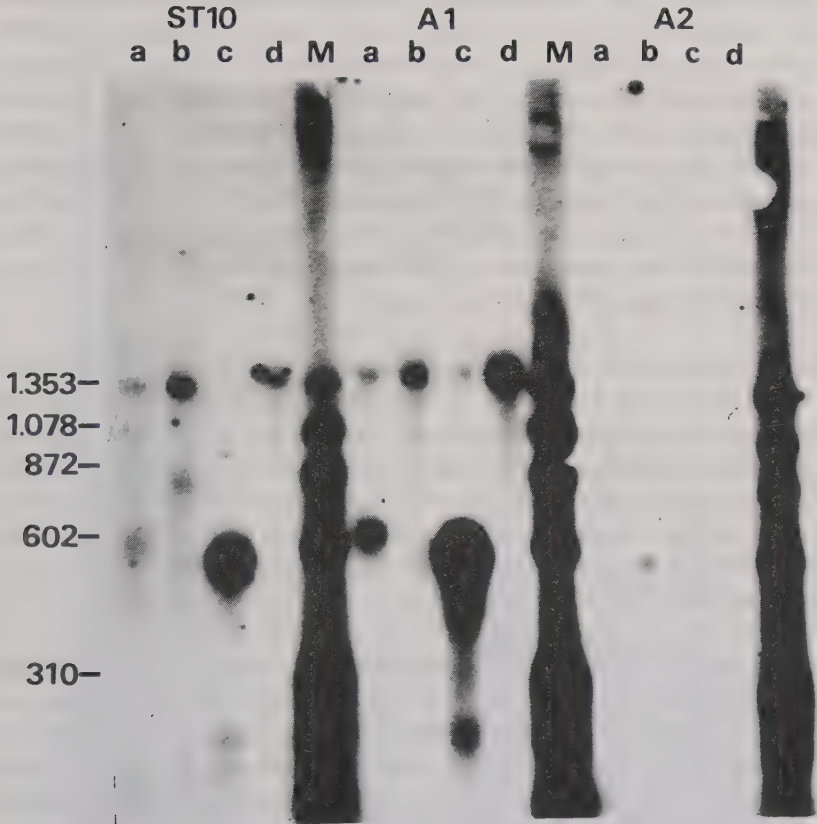


Abb. 32: Northern-Blot-Hybridisierung von Gesamt-RNA aus je einem Hefe-Klon, der mit pAL 401 (a), pAL 402 (b), pAL 403 (c) und dem Kontrollplasmid YEp351 (d) transformiert worden war. Die Hybridisierung der drei Filter erfolgte mit den radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotiden ST10 (hybridisiert an Exon 2 von Actin), A1 (hybridisiert an reife Actin-mRNA) und A2 (hybridisiert an die Polylinker-Region von AL 401- und AL 402-Transkripten). M = phiX174 x HaeIII.

Filter 2 wurde mit dem Oligodeoxynukleotid A1 hybridisiert, das für reife, gespleißte mRNA spezifisch ist. Damit konnte die Zuordnung der mRNA-Banden von Filter 1 nochmal überprüft werden: Nur diese sind hier zu erkennen. Sie lagen an den selben Positionen wie auf Filter 1. Bei AL 402 ist die Bande nur sehr schwach zu erkennen. Da nur 7 Nukleotide von Actin-Exon 1 hier erhalten sind, können nur 17 der 19 Nukleotide des Oligodeoxynukleotides basenpaaren, was den Schmelzpunkt des Hybrids von 56°C auf 50°C senkt; dies entspricht der Temperatur, bei der die Filter nach der Hybridisierung gewaschen wurden. Sowohl bei Filter 1 als auch bei Filter 2 ist bei allen Proben eine Bande mit einer Länge von ca. 1360 Nukleotiden zu sehen, auch bei der Kontrolle, die nur mit YEp351 transformiert worden war. Diese entspricht der endogenen mRNA für Actin, die 1268 Nukleotide + Poly(A)-Schwanz lang ist.

Filter 3 wurde mit dem Oligodeoxynukleotid A2 hybridisiert. Dieses ist komplementär zu einem Bereich nahe dem 5'-Ende der Prä-mRNAs von AL 401 und 402, der dem Polylinker in den Plasmiden entspricht. Ein Transkript von AL 403 sollte damit nicht identifiziert werden können, ebenso wenig wie die endogene mRNA für Actin. Tatsächlich schienen nur für AL 401 und 402 Banden, die den Vorläufer-RNAs und den mRNAs entsprachen, auf. Hier läßt sich recht gut das Verhältnis von Vorläufer-mRNA zu mRNA bei AL 402 abschätzen, das ca. 2 : 3 beträgt, was auf eine Spleißeffizienz von etwa 60 % schließen läßt.

Um zu klären, ob die durch Northern-Blot-Hybridisierung ermittelten Transkripte, die von den Konstrukten pAL 401 und pAL 402 abgelesen wurden, überhaupt von RNA-Polymerase I transkribiert wurden, führe man eine Primer Extension zur Bestimmung des Transkriptionsstarts durch (zum Vergleich siehe 2.2.2.2.). Als Primer wurde das Oligodeoxynukleotid A2 verwendet, das an die Polylinker-Region im ersten Exon, die bei den drei Konstrukten mit Polymerase I-Promotor, pAL401, pAL402 und PIMYEp identisch war, hybridisieren konnte. Es ist zu 17 Nukleotiden, die auf DNA-Ebene dem Bereich von der EcoRI- bis zur SmaI-Restriktionsschnittstelle vom pUC13-Polylinker entsprechen, komplementär. Dann wurden der Reversen Transkriptase alle vier dNTPs in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Sie konnte so den Primer bis zum 5'-Ende der RNA-Vorlage verlängern, wodurch der Transkriptionsstart für die Mutanten bestimmt werden konnte. Als Längenstandard dienten einige Oligodeoxynukleotide von definierter Länge, die radioaktiv markiert worden waren.

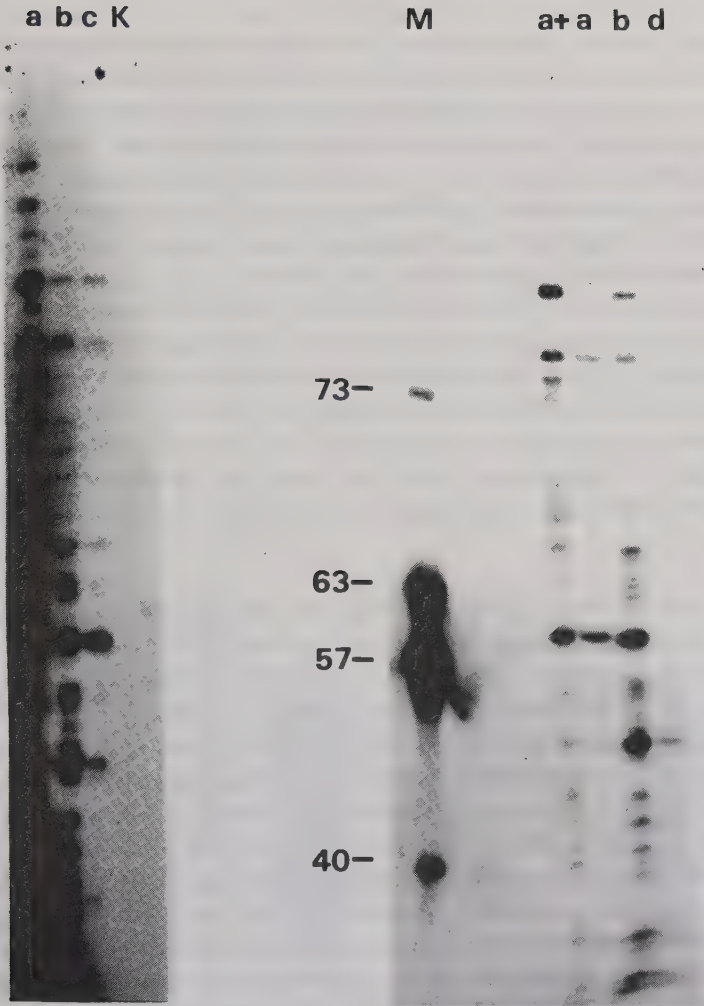


Abb. 33: Bestimmung des Transkriptionsstarts für die Konstrukte pAL 401 (a), pAL 402 (b) und PIMYE_p (c). Als Kontrollen dienten Klone, die mit pAL 403 (d) oder YEp351 (K) transformiert worden waren. Die Bestimmung erfolgte durch Primer Extension unter Verwendung des Oligodeoxynukleotids A2 (hybridisiert an den Polylinkerbereich) als Primer und aller vier Deoxynukleotide, ohne Dideoxynukleotid. Ausser im Fall a+, bei dem Poly(A)⁺-RNA von AL 401 zur Untersuchung herangezogen wurde, wurde immer Gesamt-RNA eingesetzt.

In Abb.33 ist das Ergebnis dieser Versuche, bei denen neben AL 401 und AL 402 auch PIMYEp analysiert wurde, dargestellt: Da der Primer 17 Nukleotide lang ist und das Startnukleotid für das ribosomale Primärtranskript in diesen Konstrukten 43 Nukleotide 5' von der Hybridisierungsregion liegt, sollte ein korrekt von RNA-Polymerase I initiiertes Transkript ein Primer Extension-Produkt von 60 Nukleotiden ergeben. Tatsächlich sticht in allen Fällen eine Bande dieser Länge deutlich heraus. Zusätzlich sind in jedem Fall noch kürzere und längere Banden zu erkennen. Erstere resultieren wahrscheinlich aus einem vorzeitigen Abfallen der Reversen Transkriptase, zweitere lassen auf einen oder mehrere Transkriptionsstarts 5' vor dem für 37S rRNA schließen. V. a. bei AL 401 (a) sind zwei davon sehr deutlich zu sehen, bei AL 402 und PIMYEp sind es deutlich weniger. Der Anteil der korrekt startenden Transkripte beträgt bei AL 401 ungefähr 50 %, bei den beiden anderen ca. 90 %. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus einem Hefe-Klon, der mit dem Kontroll-Plasmid YEp 351 transformiert worden war (K) und aus AL 403 (d), bei der das Oligodeoxynukleotid nicht hybridisieren kann. Hier sind nur wenige, kurze Banden sichtbar, die einen störenden Effekt, etwa durch eine Kreuzhybridisierung des Oligodeoxynukleotids A 1 mit einer anderen, unspezifischen RNA-Spezies ausschließen lassen.

Um zu klären, ob die in obigem Versuch identifizierten RNA-Spezies tatsächlich polyadenyliert waren, wie es ihre Größe nach dem Northern Blot vermuten ließ, wurde mittels Affinitätschromatographie auf einer Oligo(dT)-Säule die Poly(A)⁺-Fraktion aus der Gesamt-RNA isoliert. Zurück blieb die Poly(A)⁻-Fraktion. Poly(A)⁺- und Poly(A)⁻-RNAs aus drei Actin-Transformanten, AL 401 (a), AL 402 (b) und PIMYEp (c) wurden nebeneinander auf einem Glyoxalgel aufgetrennt und durch Northern-Blots analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit den Oligodeoxyribonukleotiden A1 und ST10. Es konnten wieder die gleichen Banden identifiziert werden wie bei der Gesamt-RNA, aber ausschließlich in der Poly(A)⁺-Fraktion (Abb.34). Daraus folgt, daß alle actin-spezifischen Transkripte, die von den Konstrukten AL401, 402 und 403 abgelesen wurden, polyadenyliert waren, wobei der vorgeschaltete Promotor (für Polymerase I oder II) keine Rolle spielte. Die Spleißeffizienz von AL 401 läßt sich hier mit etwa 90 % abschätzen, da auch noch etwas Vorläufer-RNA vorhanden ist. Für die Poly(A)⁺-RNA von AL 401 (a+) wurde nochmals eine Primer Extension zur Bestimmung des 5'-Transkriptionsstarts durchgeführt und im Vergleich zu Gesamt-RNA aus AL 401 (a) und AL 402 (b) analysiert (Abb. 33). Dabei zeigt sich kein Unterschied zum Ergebnis mit Gesamt-RNA.

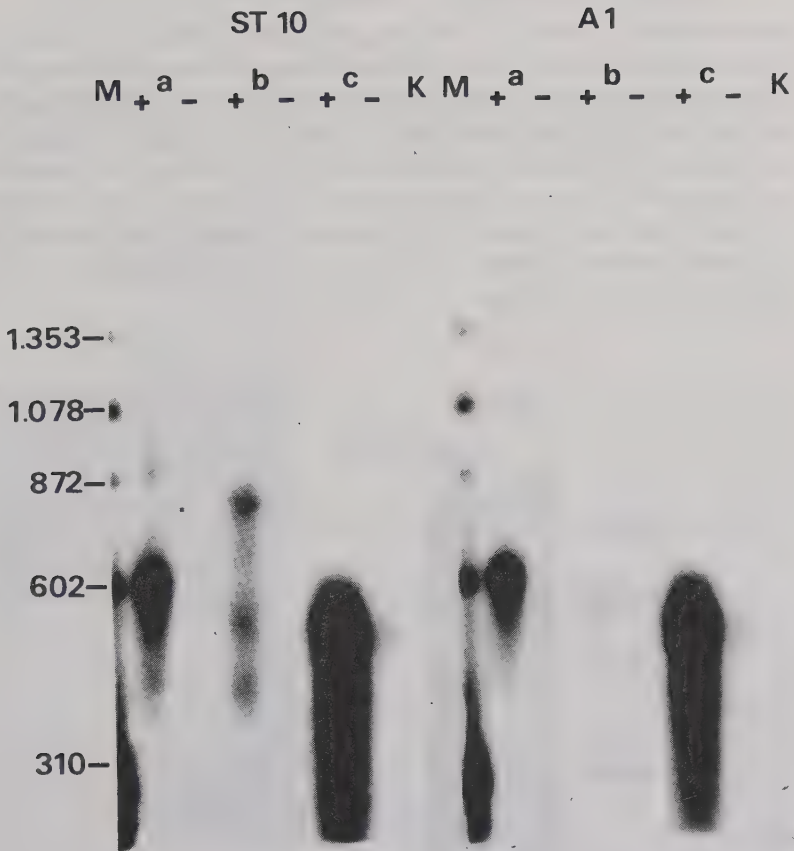


Abb. 34: Northern-Blot-Hybridisierung von Poly(A)⁺ (+) und Poly(A)⁻-RNA (-) aus Hefe-Klonen, die mit pAL401 (a), pAL 402 (b) und pAL 403 (c) transformiert worden waren. Die Hybridisierung der beiden Filter erfolgte mit den radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotiden ST10 (hybridisiert an Exon 2 von Actin-RNA) und A1 (hybridisiert an reife Actin-mRNA). Als Kontrolle (K) diente Gesamt-RNA aus einem Klon, der mit YEp351 transformiert war. M = phiX174 x HaeIII.

2.4.3 Analyse der *In vivo*-Spleißreaktion und -Spleißeffizienz des MATa1-Konstrukts

Auch das MATa1-Transkript von PIMYE_p wurde durch Northern-Blot-Analyse und Primer Extension auf seine Spleißeffizienz und den Transkriptionsstart hin untersucht. In Abb.35 ist das Ergebnis eines Northern-Blots von Gesamt-RNA aus PIMYE_p zu sehen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Oligodeoxynukleotid KK5, das für Exon 2 spezifisch ist, und zeigt eine Bande, die in ungefähr der Länge der erwarteten, reifen, gespleißten mRNA entspricht (Vorläufer mit beiden Introns: 1128 Nukleotide; reife mRNA nach Herausschneiden beider Introns: 1022 Nukleotide, siehe Abb. 36), wenn hier der Polymerase I-Terminator verwendet wurde. Eine Polyadenylierungsstelle ist in diesem MATa1-Konstrukt nicht enthalten.

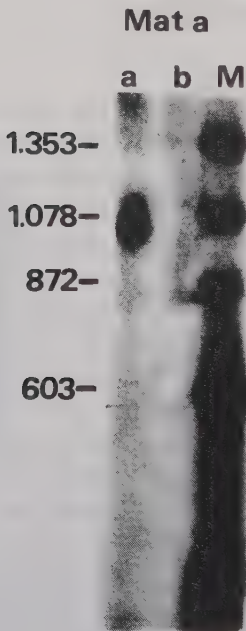


Abb. 35: Northern-Blot-Hybridisierung von Gesamt-RNA aus Hefeklonen, die mit PIMYE_p (a) und dem Kontrollplasmid YEp351 (b) transformiert worden waren. Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotid, das spezifisch für das zweite Exon von MATa1 ist (KK5). M= phiX174 x HaeIII.

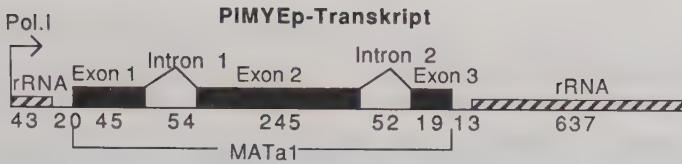


Abb. 36: Schematische Darstellung der PIMYEp-Primär-RNA, wie sie nach Transkription durch die RNA-Polymerase I (Pol. I) aussehen sollte. Die Zahlen geben die Länge der jeweils aufgeführten Bereiche in Nukleotiden an.

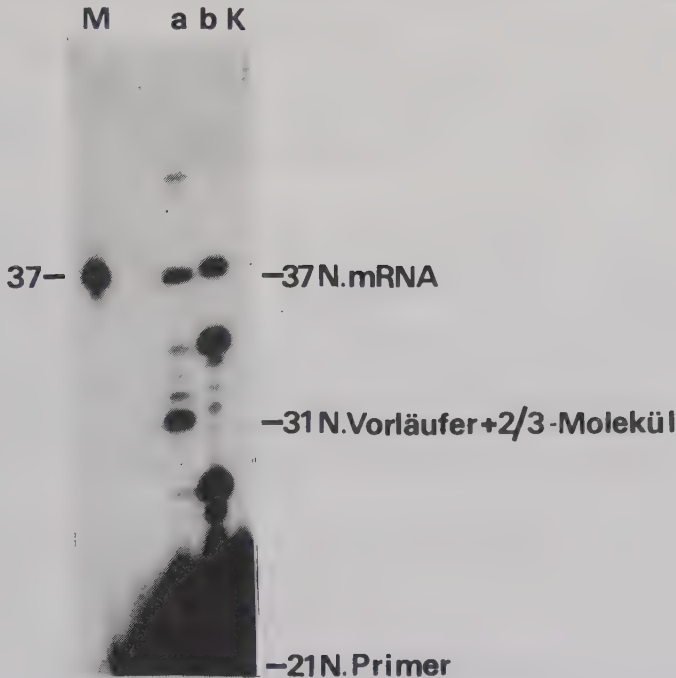


Abb. 37: Analyse der Spleißreaktion von PIMYEp-spezifischer RNA (a) durch Primer Extension unter Verwendung des radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotides KK5 (spezifisch für das 2. Exon von MATa1, 21 Nukleotide lang) als Primer und des Dideoxynukleotides ddGTP. Gesamt-RNA wurde eingesetzt; als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus einem Klon, der mit einem Plasmid transformiert worden war, das vor dem MATa1-Gen einen RNA-Polymerase II-Promotor trägt (b), und Gesamt-RNA aus einem Klon, der mit YEp351 transformiert worden war (K). Im Fall von Vorläufer- und 2/3-Molekül verlängerte sich der Primer auf 31 Nukleotide, im Fall von herausgespleißtem, ersten Intron (hier: mRNA) auf 37 Nukleotide. Als Marker (M) diente ein Oligodeoxynukleotid von 37 Nukleotiden Länge.

Mit einer "Primer Extension"-Analyse von Gesamt-RNA aus PIMYEp, unter Verwendung des Oligodeoxynukleotids KK5 und des Dideoxynukleotids ddGTP, wurde das Spleißverhalten der PIMYEp-Transkripte untersucht. Dies war möglich, da es sich bei dem transformierten Hefestamm um einen vom "Mating type" alpha handelt und so keine Hintergrundbanden von endogenen RNA-Spezies zu erwarten waren, die das Ergebnis verfälscht hätten. Das Oligodeoxynukleotid KK5, das 21 Nukleotide lang ist, wird im Falle von Vorläufer-RNA oder 2/3-Molekül auf 31 Nukleotide und im Fall von gespleißter RNA (immer bezogen auf das 1. Exon) auf 37 Nukleotide verlängert. Als Kontrolle diente RNA aus einer Mutante, bei der MATA1 von einem Polymerase II-Promotor aus transkribiert wurde (Geschenk von K. Köhrer, dieses Labor). Wie in Abb.35 zu sehen ist, betrug die Spleißeffizienz bei dieser Polymerase II-Kontrolle (b) 100%, bei PIMYEp (a) dagegen nur ca. 40 %. Als Längenmarker diente ein radioaktiv markiertes Oligodeoxynukleotid von 37 Nukleotiden Länge und als Kontrolle Gesamt-RNA aus einem YEp351-Kontroll-Klon.

Auch für PIMYEp spezifisches Transkript wurde, wie bereits unter 2.4.2. erwähnt, der Transkriptionsstart durch Primer Extension bestimmt. Dabei wurde auch das Oligodeoxynukleotid A2 als Primer benutzt. Die Durchführung entsprach der bei den Actin-Konstrukten. In Abb. 32 ist das Ergebnis zu sehen: Auch für PIMYEp (c) sticht die Bande, die einem Primer Extension-Produkt von 60 Nukleotiden entspricht, besonders stark heraus. Sie markiert einen Transkriptionsstart, der dem der ribosomalen Vorläufer-RNA entspricht. Korrekt von RNA-Polymerase I abgelesenen Transkripte von PIMYEp machen demnach einen Großteil, nämlich ca. 90 % der hier gebildeten Transkripte aus.

3. Diskussion

3.1. Präparation von Spleißextrakten aus Hefezellen im Vergleich zu denen aus höheren Eukaryonten

In vitro-Spleißsysteme sind eine wesentliche Voraussetzung zur Erforschung des Prä-mRNA-Spleißens, welches einen der Prozessierungsschritte auf dem Weg von der genetischen Information zur reifen mRNA darstellt. Für höhere Eukaryonten sind solche *In vitro*-Spleißsysteme bereits seit 1983 beschrieben (Padgett *et al.*, 1983; Hernandez und Keller, 1983), wobei diese Untersuchungen Transkription und Spleißen meist in einem gemeinsamen Ansatz in Gesamtzell-Extrakten durchführten. Zur genaueren Analyse der Spleißreaktion ist es aber vorteilhafter, diese beiden Schritte zu entkoppeln, also erst ein bestimmtes Primär-Transkript *in vitro* herzustellen und dieses dann in einem zweiten Schritt, wiederum *in vitro*, zu spleißen. Hier war es zunächst das zellfreie SP6-Transkriptionssystem, das sich hervorragend zur Bereitstellung sehr spezifischer Transkripte in größeren Mengen eignete (Butler und Chamberlin, 1982). Vor seiner Verfügbarkeit war man darauf angewiesen, die gewünschte RNA aus HeLa-Zellen, die mit Adenoviren infiziert worden waren, zu gewinnen (Goldenberg und Hauser, 1983) oder sie in Hela-Gesamtzell-Extrakten unter nicht-spleißenden Bedingungen transkribieren zu lassen (Hernandez und Keller, 1983), was in beiden Fällen zu relativ geringen Ausbeuten führte. Daß sich SP6-Transkripte gut für Spleißuntersuchungen eignen, zeigte sich in Experimenten, bei denen sie in Frosch-Oozyten-Kerne injiziert wurden (Green *et al.*, 1983). Schließlich gelang es Krainer *et al.* (1984), einen Kernextrakt aus HeLa-Zellen mit guter Spleißeffizienz zu gewinnen, in dem SP6-Transkripte von einem menschlichen beta-Globin-Gen korrekt gespleißt wurden.

Die vorliegende Arbeit hatte es zum Ziel, das Prä-mRNA-Spleißen in Hefe zu untersuchen, wobei auch hier ein *In vitro*-Spleißsystem benötigt wurde. Die Spleißreaktion läuft in Hefe *in vivo* im Prinzip mit einem sehr ähnlichen Mechanismus ab wie in höheren Eukaryonten, wobei auch hier die typischen verzweigten Moleküle, 2/3-Molekül (Intermediat der Spleißreaktion) und herausgeschnittenes Intron (Endprodukt), auftreten (Domdey *et al.*, 1984). Nur die Sequenzvoraussetzungen im Intron sind stringenter und gehen über die GT-AG-Regel hinaus: Insbesondere durch das Vorhandensein einer hochkonservierten Sequenz am 5'-Ende (GTATGT) und der ebenso hochkonservierten TACTAAC-Box am Verzweigungspunkt unterscheidet sich die Spleißreaktion in Hefe von der in höheren

Eukaryonten (Langford und Gallwitz, 1983). Aus diesem Grund können auch z.B. in Hefe fremde Introns, die keine Gallwitz-Box besitzen, nicht korrekt entfernt werden (Langford et al., 1983; Watts et al., 1983).

Die Bemühungen, auch aus Hefe einen aktiven Spleißextrakt zu gewinnen, führten erst einige Jahre nach den ersten diesbezüglichen Ergebnissen bei höheren Eukaryonten zum Erfolg. Der Gesamtzellextrakt (S 100) aus *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Gewinnung während dieser Arbeit entwickelt wurde und der Spleißaktivität besaß, entsprach in seiner Zusammensetzung weitgehend dem, der Ende 1985 auch von Lin et al. (1985) beschrieben wurde. Versuche, auch aus Hefe-Kernen Extrakte mit Spleißaktivität zu präparieren, zeigten trotz verschiedener Prozeduren bei ihrer Herstellung nicht den gewünschten Erfolg (Lin et al., 1985). Dies scheint einen Unterschied zum Spleißsystem in höheren Eukaryonten wiederzuspiegeln, wo im Gegensatz dazu Kernextrakte besser für *In vitro*-Spleißversuche geeignet sind als solche, die aus Gesamtzellen gewonnen werden. Dies läßt vermuten, daß bei der Präparation von Hefe-Kernextrakten wichtige Komponenten für das Spleißen verloren gehen, die sich in der cytoplasmatischen Fraktion befinden.

Hefe bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber höheren Eukaryonten, die Spleißreaktion zu untersuchen: Abgesehen von der relativ leichten Handhabbarkeit von Hefe-Kulturen und ihrer Aufarbeitung, ist dies die Möglichkeit, mit Hilfe genetischer Strategien die Komponenten, die an der Spleißreaktion beteiligt sind, zu gewinnen. Gerade dazu wiederum ist es notwendig, *In vitro*-Versuche durchführen zu können, wozu man einen aktiven Spleißextrakt benötigt. In dieser Arbeit wurden Spleißextrakte zur Untersuchung von Voraussetzungen herangezogen, die mRNA-Primärtranskripte erfüllen müssen, um korrekt und effizient gespleißt zu werden. Das Augenmerk richtete sich dabei auf Eigenschaften der Vorläufer-RNAs, die zusätzlich zu den konservierten Sequenzen in den Introns vorhanden sein müssen, um die korrekte Prozessierung der Prä-mRNA zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit wurden v. a. Eigenschaften der Vorläufer-Moleküle untersucht, die nicht das Intron betrafen, sondern die notwendige Mindestlänge der Exons, Abhängigkeit von der Struktur des 5'-Endes der RNA und Zusammenhänge zwischen Transkription und Spleißen, bzw. zwischen den verschiedenen RNA-Prozessierungsschritten.

3.2. Charakterisierung der *In vitro*-Spleißreaktion in Hefe

Die Charakterisierung der Spleißreaktion zeigte einige bemerkenswerte Eigenschaften auf, die z. T. im Gegensatz zur Situation in höheren Eukaryonten stehen:

Beim zeitlichen Verlauf der Reaktion zeigte sich ein Unterschied besonders deutlich: In HeLa-Spleißextrakten gibt es eine lange Verzögerungszeit von ca. 45 Minuten, bevor die ersten Spleißprodukte entdeckt werden können. Das gilt sowohl für den Kern-Extrakt (Krainer *et al.*, 1984) als auch für den Gesamtzell-Extrakt (Hardy *et al.*, 1984). In Hefe dagegen kann man schon nach 10 Minuten reifes Produkt erkennen. Offenbar erfolgt im Hefesystem die Ausbildung der Strukturen, die zum Spleißen notwendig sind, wesentlich schneller als im HeLa-System. Dies ist insofern bemerkenswert, als in Hefe-Extrakten, ebenso wie in HeLa-Extrakten, größere Spleißkomplexe (allerdings nur 40 S, nicht 60 S) ausgebildet werden müssen (Brody und Abelson, 1985), die snRNAs enthalten (Cheng und Abelson, 1986; Pikielny und Rosbash, 1986), und auch der Bedarf an Kofaktoren (ATP, Mg^{2+}) ähnlich ist.

Bei den Kofaktoren benötigt die Reaktion zunächst ATP, wobei ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analog, wie (beta-gamma)-Methylen-ATP (AMPPCP) kein Ersatz dafür ist. Wie die Glyceringradienten-Analyse von Spleißkomplexen (Brody und Abelson, 1985) zeigt, wird ATP offenbar zur Ausbildung von Spleißkomplexen benötigt.

Ebenso wichtig sind zweiwertige Ionen für die Reaktion, wie das völlige Ausbleiben von Spleiß-Intermediaten oder -Produkten nach EDTA-Behandlung zeigt. Interessant ist dabei, daß andere Ionen als Mg^{2+} , welches normalerweise in der Reaktion eingesetzt wird, wie z. B. Mn^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} , dieses ersetzen können.

Interessant ist die Wirkung von RNase-Inhibitoren auf die Spleißreaktion. Während RNasin aus menschlicher Plazenta weder im positiven noch im negativen Sinn eine Veränderung bewirkt, führt Vanadyl-Adenosin ab einer Konzentration von 5 mM zum völligen Erliegen der Reaktion. Vanadyl-Adenosin ist ein Analog der zyklischen 2',3'-Monophosphat-Übergangszustände, wie sie bei der Katalyse durch Ribonukleasen postuliert werden (Puskas *et al.*, 1982) und inaktiviert die meisten bekannten Ribonukleasen. Dies könnte evtl. bedeuten, daß auch beim mRNA-Spleißen die Schnitte zwischen den Exons und dem Intron von einer Ribonuklease-Aktivität durchgeführt werden; vergleichbares fand man beim Spleißen der tRNA-Vorläufer in Hefe, wo eine membrangebundene Endonuklease isoliert werden konnte, die das tRNA-Intron unter

Bildung von 5'-Hydroxyl- und 2',3'-Phosphodiester-Enden herausschneidet (*Peebles et al.*, 1983). Ein entscheidender Unterschied ist natürlich, daß beim ersten Schritt der mRNA-Spleißreaktion, nämlich der Spaltung zwischen Exon 1 und Intron, kein freies 2',3'-Phosphodiester-Ende des Introns entsteht, sondern daß das dort befindliche Guanosin eine ungewöhnliche 2',5'-Phosphodiester-Bindung mit dem letzten Adenosin der UACUAC-Sequenz (TACTAAC-Box) eingeht, was zu der bereits erwähnten, verzweigten Lassoform führt. Diese behält das Intron auch nach dem zweiten Schritt der Reaktion bei, nämlich dem Schnitt zwischen Intron und Exon 2 und der gleichzeitigen Verknüpfung der Exons.

3.3. Bedeutung der Exon-Längen für die Spleißreaktion

Nachdem die Bedingungen der Hefe-Spleißreaktion *in vitro* ausreichend charakterisiert und optimiert worden waren, konnten mit diesem System Untersuchungen zum Spleißmechanismus durchgeführt werden. Dabei interessierte zunächst die Frage, ob Exonbereiche der Vorläufer-mRNAs nicht doch in irgendeiner Form eine Rolle beim Spleißprozeß spielen, z. B. dadurch, daß bestimmte Mindestlängen eingehalten werden müssen. Für Hefe lagen vor dieser Arbeit nur Daten zum zweiten Exon vor (*Rymond und Rosbash*, 1985). Danach wird die Spleißreaktion durch Verkürzen dieses Exons auf 10 Nukleotide nicht beeinträchtigt, und wenn das Vorläufer-Molekül bis ins Intron hinein verkürzt wird, also die 3'-Spleißstelle ganz fehlt, kann immer noch der erste Schritt der Reaktion stattfinden. Die Verkürzungen in diesem Experiment wurden durch RNaseH-Verdau am fertigen SP6-Transkript erreicht, was keine Angaben zu den verbleibenden Längen auf das Nukleotid genau erlaubt.

Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit benutzt, um erste Hinweise auf die Auswirkung von Exon-Verkürzungen auf die Spleißreaktion zu gewinnen. Das oben erwähnte Ergebnis für das zweite Exon wurde so bestätigt: Es findet auch bei einer Exon2-Länge von ca. 5 Nukleotiden noch eine Reaktion statt, wobei bei diesem Versuchsansatz nicht endgültig geklärt wurde, ob beide Schritte der Reaktion oder nur der erste durchlaufen wurden. Für das erste Exon ergaben diese Versuche zunächst, daß ein Vorläufer-Molekül mit einer Exon 1-Länge von ca. 50 Nukleotiden beide Schritte der Reaktion durchlaufen kann, wohingegen eines mit einer Exon 1-Länge von nur ca. 6 Nukleotiden nur noch in geringem Ausmaß dazu in der Lage ist. Dieses Ergebnis ließ es sinnvoll erscheinen, nun Versuche mit exakten Exon1-Verkürzungen, die eine Aussage

über die Länge auf das Nukleotid genau zuließen, durchzuführen. Dazu bot sich die Exon-verkürzung durch gerichtete Mutagenese mit Oligodeoxynukleotiden an (*Newman et al.*, 1983). Mit den so erhaltenen Exon 1-Mutanten war eine detailliertere Aussage möglich.

Es zeigte sich, daß eine Exon 1-Länge von 12 Nukleotiden noch ausreicht, um eine Prä-mRNA korrekt zu spleißen. Eine Exon 1-Länge von 5 Nukleotiden und darunter dagegen führte dazu, daß eine Vorläufer-RNA nur noch den ersten Schritt der Reaktion durchlaufen kann: Es wird nur noch das Reaktions-Intermediat 2/3-Molekül gebildet, jedoch keines der beiden Endprodukte mRNA oder Intron. Dieselbe Situation ergibt sich auch bei einem Vorläufer-Molekül mit einer Exon 1-Länge von 1 Nukleotid; allerdings ist hier die Effizienz des ersten Reaktionsschritts schon deutlich geringer. Erst wenn das erste Exon ganz fehlt, die Exon 1-Länge also 0 Nukleotide beträgt, kommt auch der erste Reaktionsschritt zum Stillstand. Dies ist nicht von vorn herein zu erwarten, da ja in diesem Fall noch die cap-Struktur oder zwei Phosphatgruppen der 5'-Triphosphatgruppe 5' von der Spleißstelle vorhanden sind. Die Bindung, die dabei allerdings gespalten werden müsste, ist keine Phosphodiester-Bindung, wie sie in einem Vorläufer-mRNA-Molekül vorliegt, das noch den ersten Schritt der Spleißreaktion durchlaufen kann, sondern eine Phosphoanhydrid-Bindung. Diese wird offensichtlich von der Spleißmaschinerie nicht gespalten. In allen beschriebenen Fällen aber werden, wie die entsprechenden Analysen zeigen, Spleißkomplexe, die bei etwa 40 S sedimentieren, ausgebildet, egal ob beide Spleißreaktionsschritte, nur der erste oder keiner durchlaufen werden.

Um noch einmal die Auswirkung von Exon 2-Verkürzungen zu untersuchen, wurden durch Restriktionsspaltungen der Transkriptionsvektoren an geeigneten Schnittstellen diesmal definierte Längen des 2. Exons bei der Transkription erreicht. Es interessierte v.a., ob solche Verkürzungen des 2. Exons Auswirkungen auf das Spleißverhalten der Exon 1-Mutanten haben. Die kürzeste Exon 2-Länge betrug 8 Nukleotide und bewirkte keinerlei Veränderung im Spleißverhalten gegenüber Konstrukten mit längeren Exons. Für ein Konstrukt mit einer Exon 1-Länge von 19 Nukleotiden und einer Exon 2-Länge von 8 Nukleotiden wurde auch der Beweis dafür geführt, daß tatsächlich beide Reaktionsschritte und nicht nur der erste in diesem Fall durchlaufen wurden.

Was bedeutet dies alles für den Spleißmechanismus? Zunächst erscheint es nicht wahrscheinlich, daß Exon 1-Sequenzen in Hefe irgendeine Rolle bei der Ausrichtung der 5'-Spleißstelle mit Hilfe der snR19 spielen. snR19 ist eine snRNA aus Hefe (*Kretzner et al.*, 1987; *Siliciano et al.*, 1987) und in den ersten 11 Nukleotiden am 5'-Ende identisch zur menschlichen U1, für die bereits 1980 wegen ihrer Basen-Komplementarität zur

5'-Spleißstelle einer Prä-mRNA eine Beteiligung am Spleißen vermutet wurde (*Lerner et al.*, 1980). Eine Interaktion zwischen beiden Molekülen konnte schon gezeigt werden (*Zhuang und Weiner*, 1986). Das Pendant in Hefe nun, snR19, ist ebenfalls Bestandteil von Spleißkomplexen. Wenn sich aber Spleißkomplexe ausbilden können, auch wenn die Spleißreaktion überhaupt nicht durchlaufen werden kann, weil das erste Exon der Vorläufer-RNAs fehlt, dann scheint eine Wechselwirkung zwischen snRNA19 und Vorläufer-RNA in den Exon-Bereichen nicht denkbar.

Trotzdem muß die Prä-mRNA aber eine Mindestlänge des ersten Exons besitzen, um vollständig gespleißt zu werden. Eine möglich Erklärung dafür wäre, daß das nach dem ersten Reaktionsschritt abgespaltene Exon 1 nur dann vom Spleißkomplex festgehalten werden kann, um für den zweiten Reaktionsschritt - die Ligierung der beiden Exons - verfügbar zu sein, wenn es eine Mindestlänge nicht unterschreitet, die im vorliegenden Fall 12 Nukleotide beträgt. Für den ersten Schritt der Reaktion dagegen genügt schon ein Exon 1 von einem Nukleotid Länge. Nach den hier gewonnenen Ergebnissen reichen also bei Hefe Exon-Längen von 12 (Exon 1) und 8 (Exon 2) Nukleotiden aus, um die komplette Spleißreaktion zu ermöglichen. Das steht im Einklang mit dem kürzesten in Hefe gefundenen Exon von 16 Nukleotiden, aber im Widerspruch zu Ergebnissen aus höheren Eukaryonten, wo zumindest für das 2. Exon eine Mindestlänge von ca. 20 Nukleotiden benötigt wird, um den zweiten Schritt der Spleißreaktion zu ermöglichen (*Furdon und Kole*, 1986; *Parent et al.*, 1987). Für das erste Exon liegen hier keine genauen Angaben vor, ausser daß eine Exon 1-Länge von nur 24 Nukleotiden noch keine Beeinträchtigung der Spleißeffizienz bewirkt (*Parent et al.*, 1987).

Wie sich aus obigen Versuchen zeigt, spielt die Länge der Exons bei der Spleißkomplexbildung keine Rolle. Auch der erste Schritt der Reaktion kann noch bei einem Nukleotid Länge von Exon 1 stattfinden, nur für den zweiten Schritt wird eine Mindestlänge von hier 12 Nukleotiden erforderlich. Dies scheint die allgemeine Theorie zu untermauern, daß im Intron alle nötigen Spleißsignale enthalten sind. Experimente, bei denen Exon-Sequenzen mutiert oder ausgetauscht wurden, bestätigen das. So führen z. B. Basenveränderungen an den drei Positionen, die dem großen Intron von beta-Globin-Transkripten aus Kaninchen vorausgehen, zu keiner nennenswerten Reduktion der Spleißeffizienz (*Aebi et al.*, 1986).

3.4. Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Struktur des 5'-Endes der Prä-mRNA

Was den Einfluß der cap-Struktur auf die Spleißreaktion betrifft, so gehen bei höheren Eukaryonten hier die Ergebnisse der Experimente auseinander. Während *Krainer et al.* (1984) fanden, daß ein Vorläufer-Molekül mit 5'-Triphosphatgruppe in einem HeLa-Kernextrakt mit etwas geringerer Effizienz und Genauigkeit gespleißt werden kann als eines mit 5'-cap-Struktur, fanden *Konarska et al.* (1984) im Gesamtextrakt völlige Hemmung der Reaktion, wenn die Prä-mRNA kein cap trug. Bestätigt wurden die Ergebnisse von *Konarska et al.* auch von *Ederly et al.* (1985); beide konnten v. a. zeigen, daß eine Präinkubation des Extrakts mit einem Überschuß an cap-Analog, m⁷GpppG, die Spleißreaktion in HeLa-Extrakten völlig zum Erliegen bringt, sowohl im Kern- als auch im Gesamt-Extrakt. Schließlich scheint bei HeLa bereits die Ausbildung von Spleißkomplexen cap-Abhängig zu sein (*Patzelt et al.*, 1987).

In dieser Arbeit wurden mehrere Transkripte untersucht, die am 5'-Ende entweder eine cap-Struktur oder eine 5'-Triphosphat-, 5'-Monophosphat oder 5'-OH-Gruppe trugen. In den letzten beiden Fällen läßt sich ein nachträgliches Anfügen der cap-Struktur durch die Guanylyl-Transferase ausschließen, was sich auch in dem stärkeren Abbau der Transkripte im Extrakt widerspiegelte. Für jeden der genannten Fälle wurde untersucht, ob sich durch Zugabe von cap-Analog bei der Reaktion oder durch Präinkubation des Extrakts mit cap-Analog die Reaktion hemmen ließ. Alle diese Versuche ließen jedoch keinerlei Unterschied in der Spleißeffizienz erkennen, was darauf schließen läßt, daß es in Hefe gleichgültig für die Spleißreaktion ist, ob eine Prä-mRNA ein 5'-Ende mit cap besitzt oder nicht. Dies steht im Gegensatz zu den meisten Erkenntnissen, die zu diesem Problem in höheren Eukaryonten gewonnen wurden.

3.5. *In vivo*-Untersuchungen zum Zusammenspiel von Transkription und mRNA-Prozessierungsschritten

Um festzustellen, ob dieser Unterschied auch tatsächlich die Verhältnisse in der Zelle wiedergibt und nicht etwa durch verschiedenen Bedingungen der Spleißextrakt-Herstellung hervorgerufen wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch noch *In vivo*-Untersuchungen durchgeführt. Dadurch wurden zusätzliche Daten erwartet, nicht nur zur Überprüfung der Ergebnisse zur cap-Abhängigkeit der Spleißreaktion, sondern auch zum

Zusammenspiel von Transkription und den verschiedenen Prä-mRNA-Prozessierungsschritten miteinander. Der Weg, der dazu gewählt wurde, sah folgendermaßen aus: Es wurde ein Promotor verwendet, der normalerweise die Transkription der ribosomalen Vorläufer-RNA steuert und dieser wurde mit Sequenzen aus protein-kodierenden Genen, die normalerweise von RNA-Polymerase II transkribiert werden, kombiniert. Dazu wurde zum einen wieder das Actin-Gen benutzt, wobei man davon zusätzlich zwei verschiedene Exon 1-Längen untersuchte (AL 401 und AL 402), und das MATa1-Gen mit seinen beiden Introns und flankierenden Exon-Sequenzen. Die Actin-Konstrukte besaßen zwei Terminatoren, einen für RNA-Polymerase II mit drei nahe zusammenliegenden Polyadenylierungsstellen und zusätzlich einen für RNA-Polymerase I; das MATa1-Konstrukt dagegen besaß nur den letzteren.

Das RNA-Polymerase I-System war deshalb interessant, weil die ribosomalen Transkriptions-Einheiten von Hefe und insbesondere auch der RNA-Polymerase I-Promotor gut charakterisiert sind. So wurde das 5'-Ende der 37 S-rRNA bereits 1980 bestimmt (Bayev *et al.*, 1980; Klemenz und Geiduschek, 1980). Bayev *et al.* fanden dabei zwei Transkriptionsstartstellen, wobei eine davon nur durch S1-Analyse, nicht jedoch durch reverse Transkription entdeckt wurde und ca. 31 Nukleotide 5' von der anderen, der hauptsächlich verwendeten Transkriptionsstartstelle, zu liegen kommt. In beiden Fällen beginnen jedoch die Transkripte mit einem Adenosin, was in Übereinstimmung ist mit Daten, die Nikolaev *et al.* (1979) für das ribosomale Startnukleotid fanden. Danach trägt die 37S-rRNA am 5'-Ende ein Adenosin-Triphosphat. Dies wiederum ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Klootwijk *et al.* (1979), die als Startdinukleotid pppApU fanden, was mit dem Haupttranskriptionsstart, wie er von Bayev *et al.* bestimmt wurde, gut zusammen paßt. Auch hier wurden weitere Startdinukleotide, die für alternative Transkriptionsstarts sprechen, in geringem Ausmaß gefunden. Daß der gesamte nicht-transkribierte Spacer der ribosomalen Transkriptionseinheiten als Promotorelement für die RNA-Polymerase I benötigt wird, zeigen folgende Untersuchungen: So konnten Swanson und Holland (1983) zeigen, daß ein wichtiges Promotorelement für die ribosomale Transkription ca. 2 kb 5' vom eigentlichen Startnukleotid des ribosomalen Primärtranskripts entfernt liegt. Die RNA-Polymerase I erkennt diesen Bereich und muß danach die ca. 2 kb bis zum eigentlichen Transkriptionsstart zurücklegen und dabei auch den Bereich, der für die 5S-RNA kodiert, durchqueren. Tatsächlich scheint an dieser ungefähr 2 kb vor dem Transkriptionsstart liegenden Stelle ein wichtiges Enhancer-Element für die RNA-Polymerase I zu liegen (Elion und Warner, 1984), dessen Beseitigung die ribosomale Transkriptionseffizienz drastisch senkt. Dieses Enhancer-Element konnte von Swanson *et al.* (1985) auf eine 22 bp-Region eingegrenzt werden, die auch für sich alleine

als Promotor für die RNA-Polymerase I wirken kann. Dieses *in vitro* gewonnene Ergebnis konnte allerdings von *Elion und Warner* (1986) nicht in dieser Form bestätigt werden. Bei ihnen scheint ein 190 bp-Fragment in dieser Region nötig zu sein, um die ribosomale Transkription *in vivo* deutlich zu steigern.

Auch das 3'-Ende der 37 S ribosomalen RNA konnte präzise festgelegt werden (*Veldman et al.*, 1980). Deletionsanalysen konnten die Terminationsregion für die RNA-Polymerase I auf einen Abschnitt von 110 bp Länge begrenzen, der für sich allein genommen notwendig und ausreichend für die korrekte Terminierung des ribosomalen Primärtranskripts ist. Dieses Fragment ist also als Terminationsignal ausreichend. Interessant ist hierbei, daß Terminationsignal der einen und Enhancer-Signal der darauffolgenden ribosomalen Transkriptionseinheit direkt benachbart liegen, und es daher für möglich erachtet wird, daß die RNA-Polymerase I nach der Terminierung des einen Vorläufer-Moleküls sofort mit der Initiierung der Transkription des nächsten Vorläufer-Moleküls beginnt und so gar nicht vom Bereich der ribosomalen Transkriptionseinheiten dissoziiert. Aus dem vorher genannten geht hervor, daß die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fragmente, die als Promotor und Terminator für die RNA-Polymerase I dienen sollten, nach den Angaben in der Literatur dafür geeignet und ausreichend sein sollten.

Dies bestätigte sich in den hier aufgeführten Experimenten. Nach der erfolgreichen Transformation von Hefe mit den genannten Konstrukten konnte gezeigt werden, daß von ihnen Transkripte abgelesen wurden. Das 5'-Ende der so gebildeten Transkripte wurde durch Primer Extension ermittelt. Dabei findet sich jedoch kein einheitlicher Transkriptionsstart. Neben Transkripten, die dort beginnen, wo auch das 5'-Ende der ribosomalen Vorläufer-RNA liegt, gibt es noch längere RNA-Spezies. Insbesondere fallen dabei zwei auf, die ca. 15 bis 20 Nukleotide 5' von der gewünschten ribosomalen Startstelle beginnen. Der Anteil der längeren RNA-Spezies ist bei den verschiedenen verwendeten Konstrukten unterschiedlich hoch. Relativ gering ist der Anteil bei dem MATa1-Konstrukt PIMYEp und bei dem Actin-Konstrukt mit dem kürzeren Exon 1 (AL402); bei beiden werden relativ wenige längere Transkripte gefunden (ca. 10 %), die vor dem Startnukleotid des normalen ribosomalen Vorläufer-Moleküls beginnen. Bei dem Actin-Konstrukt mit dem längeren Exon1, AL 401, dagegen, ist der Anteil an längeren Transkripten weit höher; er liegt bei etwa 50%.

Daß Transkripte von einem Transkriptionstart abgelesen werden, der vor dem liegt, der normalerweise von RNA-Polymerase I verwendet wird, entspricht dem Bild, daß sich aus

der Transkription anderer artifizieller ribosomaler Gene in Hefe ergibt. *Kempers-Veenstra et al.* (1984) benutzten dabei allerdings ein kurzes ribosomales Promotor-Fragment von nur 135 Nukleotiden Länge, ließen also den übrigen nicht-transkribierten Spacer und das Enhancer-Element weg, und sie erhielten eine ganze Reihe längerer Transkripte von diesem Konstrukt, die vor dem ribosomalen Startnukleotid begannen. Der Transkriptionsstart wurde hier ebenfalls durch Primer Extension ermittelt. Auch *Quincey und Arnold* (1984) untersuchten die Transkription von einem artifiziellen, ribosomalen Minigen in *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei verwendeten sie zwei verschiedene Konstrukte: Bei dem einen war der lange, komplette Promotor mit Enhancer-Region vorhanden, analog zu demjenigen, der in dieser Arbeit verwendet wurde, bei dem anderen kam wieder das zuvor beschriebene, kurze Promotor-Element zur Anwendung. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, daß nur bei Verwendung des kompletten, langen Promotors mit Enhancer-Region ein einheitlicher Transkriptionsstart benutzt wurde, und zwar der für die 37S-rRNA; bei Verwendung des kurzen Promotors wurden auch alternative Transkriptionsstartstellen benutzt. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit ist deshalb von Bedeutung, da hier ja der vollständige Promotor inklusive Enhancer verwendet wurde.

Interessanterweise sind die längeren Transkripte besonders stark bei dem Actin-Konstrukt mit längerem Exon 1 (71 Nukleotide aus Actin und davor 94 Nukleotide aus anderen Bereichen) vertreten. Bei den beiden anderen Konstrukten - Actin mit kürzerem Exon 1 (davon 5 Nukleotide aus Actin und 94 Nukleotide aus anderen Bereichen) und MATa1 (hier beträgt beim ersten Exon der Anteil der Original-MATa1-Sequenzen 45 Nukleotide, 63 Nukleotide stammen aus anderen Bereichen) - ist der Anteil dieser längeren Transkripte relativ gering. Auch bei höheren Eukaryonten wurden schon Versuche unternommen, mRNA-Gene von RNA-Polymerase I transkribieren zu lassen. *Smale und Tijan* (1985) konnten für den menschlichen ribosomalen Promotor zeigen, daß von ihm auch Polymerase II-Transkripte abgelesen werden können, falls bestimmte Enhancer-Elemente aus dem Promotor entfernt werden. Nur wenn man den kompletten Promotor einsetzt, wird ausschließlich der korrekte Transkriptionsstart von der RNA-Polymerase I verwendet. Die Polymerase II-Startpunkte liegen hier ca. 15 bis 20 Nukleotide 5' vom normalen 5'-Ende der 37S-rRNA. Bei der Untersuchung von *Smale und Tijan* am ribosomalen Promotor des Menschen wurde durch alpha-Amanitin-Behandlung gezeigt, daß die Transkripte, die am gleichen Nukleotid wie die ribosomale Vorläufer-RNA beginnen, auch tatsächlich von RNA-Polymerase I abgelesen werden. Für die vorliegenden Ergebnisse bedeutet das, daß nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, daß die Transkripte, die vor dem ribosomalen Startnukleotid beginnen, von RNA-Polymerase II transkribiert werden. Allerdings spricht auch bei der Transkription des endogenen

ribosomalen Vorläufer-Moleküls einiges dafür, daß es hier alternative Transkriptionsstartstellen gibt, die etwas oberhalb der am häufigsten verwendeten Startstelle liegen.

Erkenntnisse über die Prozessierung von mRNA-Primärtranskripten, die von einer anderen als RNA-Polymerase II bereitgestellt wurden, lagen vor den hier dargestellten Ergebnissen für Hefe nicht vor. Untersuchungen dieser Art gibt es bisher nur im Säugersystem, wobei hier allerdings ein RNA-Polymerase III-Promotor verwendet wurde. Dabei gehen die Aussagen zur Prozessierung auseinander: *Lewis und Manley* (1986) fanden, daß Polyadenylierung nicht von der Transkription durch RNA-Polymerase II abhängt, da ein protein-kodierendes Gen aus dem Herpes-Virus in menschlichen Zellen durch die RNA-Polymerase III transkribiert und anschließend polyadenyliert wurde. Mit dem gleichen Promotor im gleichen Zellsystem fanden dagegen *Sisodia et al.* (1987) das Gegenteil heraus. Das von ihnen verwendete proteinkodierende Gen, ein beta-Globin-Gen, wurde zwar transkribiert, das Transkript jedoch weder polyadenyliert noch gespleißt. Sie postulierten daher eine Kopplung der Polymerase II-Transkription mit diesen Prozessierungsschritten. Wie die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, kann eine solche Kopplung in Hefe nicht bestätigt werden. Alle verwendeten Actin-Konstrukte besaßen im nachgeschalteten ADH-Terminator eine Polyadenylierungsstelle. Die Transkripte, die von ihnen abgelesen und durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen wurden, wurden an dieser Polyadenylierungsstelle terminiert, bzw. prozessiert und polyadenyliert. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Konstrukte einen Polymerase I-Promotor oder einen Polymerase II-Promotor besaßen. Da 50% bis 90% der Transkripte, die am RNA-Polymerase I-Promotor initiiert wurden, ein 5'-Ende identisch mit dem der normalen 37 S-rRNA besitzen, kann daraus gefolgert werden, daß sie auch von Polymerase I transkribiert wurden, was wiederum die Folgerung zuläßt, daß Transkription und Polyadenylierung in Hefe nicht gekoppelt sind. Eine ähnliche Schlußfolgerung kann für das Zusammenwirken von Transkription und Spleißen getroffen werden: Nachdem mindestens 50 % der AL 401-Transkripte von RNA-Polymerase I transkribiert werden, jedoch die Spleißeffizienz aller AL 401-Transkripte ca. 90 % beträgt, kann daraus geschlossen werden, daß in diesem Fall Transkription und Spleißen nicht gekoppelt sind. Das gleiche gilt für die Transkripte von AL 402 und PIMYEp, die sicher zu ca. 90 % von RNA-Polymerase I bereitgestellt werden und mit einer Effizienz von ca. 60%, bzw. 40 % gespleißt werden. mRNA-Primärtranskripte, die nicht von Polymerase II transkribiert wurden, können in Hefe also vollständig polyadenyliert und, wenn auch mit geringerer Effizienz, gespleißt werden.

Der Unterschied in der Spleißeffizienz zwischen den verschiedenen Konstrukten, insbesondere zwischen den beiden Actin-Transkripten, ist bemerkenswert auch im Hinblick auf die Ergebnisse zur Abhängigkeit der *In vitro*-Spleißreaktion von den Exon-Längen einer Vorläufer-mRNA, die weiter oben erörtert wurden. Da in den *In vivo*-Untersuchungen unter Verwendung des RNA-Polymerase I-Promotors ja in keinem der beschriebenen Fälle die kompletten Exon1-Längen auch nur in die Nähe der kritischen Minimallängen aus den *In vitro*-Untersuchungen kamen, muß das unterschiedliche Spleißverhalten wohl in dem verschieden großen Anteil der Original-Actin-Sequenzen am Exon 1 begründet sein. Es läßt sich nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, daß hier die Exon-Sequenzen selbst eine gewisse Rolle spielen. Transkripte von pAL402 besitzen ausserdem im 5'-Bereich kein AUG zur Translations-Initiation, wie dies bei Transkripten von pAL402 der Fall ist; dies könnte eine geringere Stabilität der reifen mRNA im Cytoplasma zur Folge haben, was das Bild von der Spleißeffizienz verzerren würde.

Wie bereits vorher angedeutet, läßt sich mit den oben erwähnten Experimenten auch eine weitere Aussage zur cap-Abhängigkeit der Spleißreaktion in Hefe treffen. Vieles spricht dafür, daß die "capping"-Aktivität mit der RNA-Polymerase II gekoppelt ist (Furuichi, 1978). Tatsächlich ist das eigentliche Produkt der RNA-Polymerase I, die ribosomale Vorläufer-RNA nicht mit einer cap-Struktur am 5'-Ende versehen, sondern nur mit einer Triphosphat-Gruppe (Nikolaev et al., 1979; Klootwijk et al., 1979). Daß von RNA-Polymerase I in Maus transkribierte Prä-mRNAs wahrscheinlich kein cap am 5'-Ende besitzen, zeigen die Ergebnisse von Grummt und Skinner (1985), bzw. Lopata et al. (1986), die zeigen konnten, daß diese Vorläufer-RNAs keine geeigneten Matrizen für die Proteinsynthese an Ribosomen sind. Für die Translation ist die cap-Abhängigkeit schon lange bekannt (Filipowicz, 1978; Kozak, 1978). Wenn man also davon ausgeht, daß die an der Startstelle der ribosomalen Primärtranskripte initiierten Transkripte bei den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten von RNA-Polymerase I transkribiert wurden, dann ist anzunehmen, daß diese auch keine 5'-cap-Struktur tragen. Unter Berücksichtigung der zur Spleißeffizienz erzielten Ergebnisse ist dann ebenfalls anzunehmen - mit der gleichen Begründung, wie sie auch bei der Aussage über den fehlenden Zusammenhang zwischen Transkription und Spleißen gegeben wurde - daß Spleißen in Hefe nicht von einer cap-Struktur am 5'-Ende des Vorläufer-RNA-Moleküls abhängt. Damit werden die vorher *in vitro* erzielten Resultate bestätigt. Ebenso ist die Spleißreaktion wahrscheinlich nicht davon abhängig, daß die Vorläufer-RNA polyadenyliert ist, denn auch ein Transkript von PIMYE_p, in dem gar keine Polyadenylierungsstelle vorhanden ist, konnte zumindest teilweise gespleißt werden.

Bereits Zeevi *et al.* (1981) hatten postuliert, daß Polyadenylierung einer Vorläufer-mRNA keine Vorbedingung für das Spleißen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in Hefe keine Kopplung der Transkription mit den mRNA-Prozessierungsschritten Polyadenylierung und Spleißen besteht, und daß die Prozessierungsschritte, auch unter Einschluß des "cappings", nicht voneinander abhängen. Dies scheint einen Unterschied zu den Verhältnissen in höheren Eukaryonten wiederzuspiegeln, wo es doch einige Hinweise auf solche Abhängigkeiten gibt. Vielleicht ist diese geringere Abhängigkeit der Hefe-Spleißreaktion von verschiedenen Parametern, die in höheren Eukaryonten doch eine größere Rolle spielen - dabei können auch die Ergebnisse der Exon 1-Versuche wieder herangezogen werden - eine Konsequenz der stringenteren Sequenz-Bedingungen, die in Hefe erfüllt werden müssen, damit ein Intron korrekt aus einer Prä-mRNA entfernt werden kann. Während in höheren Eukaryonten evtl. mehrere Merkmale zusammen wirken, um ein Vorläufer-Molekül zu charakterisieren, spielen bei Hefe dagegen die konservierten Sequenzen an 5'- und 3'-Spleißstellen, sowie die TACTAAC-Box eine entscheidende Rolle.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Reagentien und ihre Bezugsquellen

a) Chemikalien

Albumin, Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	Boehringer Mannheim
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid (X-Gal)	Boehringer Mannheim
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Riedel de Haen
Cäsiumchlorid	Biomol
Dextransulfat	Pharmacia
Dimethyldichlorsilan	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO, puriss.)	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Ficoll 400	Pharmacia
Glyoxal (30 % in H ₂ O)	Serva
Hepes	Serva
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Boehringer Mannheim
Ionenaustauscher AG 501-X 8(D)	Biorad
N-Laurylsarcosin (Sarcosyl), Na-Salz	Sigma
Lithiumacetat	Janssen
(gamma-Methacryloxy)-propyl-trimethoxysilan (Bindesilan)	Sigma
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	Serva
Phenol	Merck
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Merck, Sigma
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Serva, BDH
Spermidin	Boehringer Mannheim
Titriplex III (EDTA)	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Boehringer Mannheim
Triton X-100	Roth

Xylencyanol

Biorad

b) Enzyme

CIP (alkalische Phosphatase aus Kälbermagen)	22 U/ μ l	Boehringer Mannheim
DNase I		Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase I aus E.coli	5 U/ μ l	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase I, Klenow- Fragment	1 U/ μ l	Boehringer Mannheim
Lysozym, salzfrei		Cooper
Reverse Transkriptase	23 U/ μ l	Life Sciences
Restriktionsenzyme, diverse		Boehringer Mannheim
		New England Biolabs
		Pharmacia
RNase A		Boehringer Mannheim
RNase H	20 U/ μ l	ENZO
RNasin (Ribonuklease Inhibitor aus menschlicher Plazenta)	10 U/ μ l	Promega Biotec
SP6-Polymerase	20 U/ μ l	Amersham Buchler
TAP (Tobacco Acid Pyro- phosphatase)	2 U/ μ l	BRL
T4-DNA-Ligase	400 U/ μ l	Renner
		New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/ μ l	New England Biolabs
Zymolyase 100 T	100.000 U/g	Seikagaku Kogyo Co.

c) Nukleotide und Nukleinsäuren

Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim
Dideoxyribonukleotid- triphosphate (ddNTPs)	Boehringer Mannheim
t-RNA aus E.coli	Boehringer Mannheim
Hexanukleotidgemisch ("Random Hexanucleotides")	Pharmacia
DNA aus Heringssperma	Sigma

Adenosin-5'-(beta-gamma-methylen)-triphosphat (AMPPCP, Lithiumsalz)	Serva
Vanadyl-Adenosin	BRL
Guanylyl (3'-5')-Guanosin (GpG)	Sigma
Guanylyl (3'-5')-Uridin (GpU)	Sigma
Guanylyl (3'-5')-Adenosin (GpA)	Sigma
DNA-Längenstandard II: Lambda-DNA mit Hind III geschnitten	Boehringer Mannheim
DNA-Längenstandard III: Lambda-DNA mit Hind III und Eco RI geschnitten	Boehringer Mannheim
phiX174 mit Hae III geschnitten	New England Biolabs
m ⁷ G(5')ppp(5')G = cap-Analog	New England Biolabs

d) Radionukleotide

alpha- ³² P-UTP	800 Ci/mmol	Amersham Buchler
alpha- ³² P-dCTP	3000 Ci/mmol	Amersham Buchler
gamma- ³² P-ATP	5000 Ci/mmol	Amersham Buchler
alpha- ³⁵ S-dATP	600 Ci/mmol	Amersham Buchler

e) Chemikalien für Gellösungen

Agarose	BRL
"Low-melting-agarose" (LMA)	BRL
Acrylamid	Serva
N,N'-Methyl-bisacrylamid	Biorad, Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Biorad

f) Säulenmaterialien

Biogel (Agarose Beads for Gel Filtration) A-5m	Biorad
DEAE-Biogel A (Anion Exchange Gel)	Biorad
Oligo-dT-Cellulose type 3	Collaborative Research Inc.

4.1.2. Geräte und Zubehör

a) Geräte

Spannungsgeräte:		Biorad, Biotec Fischer, BRL
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Eppendorf-Kühl-Zentrifuge Kühlzentrifugen	Hettich Universal Hettich-Mikroliter Heraeus Christ Sorvall RC5C (Du Pont) Rotoren: SS34, GSA, GS-3, HB-4
	Ultrazentrifugen	Beckman TL100 (Mini- UZ) Rotor: TLV 100 Beckman L8-M Rotoren: VTI 65, VTI 80, SW 40
Wasserbäder:		Julabo UB Memmert
	Wasserbadschüttler	New Brunswick Scientific, G76
Hybridisierschrank:		Bachhofer
Schüttelinkubatoren:	für Hefe für Bakterien	New Brunswick G25 Infors HT, KF-4
Brutschränke:		Heraeus
Elektrophoresekammern		
+ Zubehör:	1) für Agarose-Gele 2) für Acryamid-Gele	Biorad Werkstatt- Eigenbau
Gel-Elutionskammer + Zubehör:		Schleicher & Schüll

Photometer:	1) Dichtebestimmung von Bakterien- und Hefe-Kulturen	Coming: Colorimeter 252
	2) DNA- und RNA-Konzentrations- Bestimmung	LKB: Ultrospect 2
Szintillationszähler:		Beckman LS 6800
b) Zubehör		
Zentrifugenbecher:	30 ml Corex	Sorvall
	Polyallomer-Becher div. Größen	Sorvall
	Polyallomer Bell Top Quick Seal	Beckman
	Polyallomer Centrifuge Tubes	Seton
Reaktionsgefäße:	Falcon Blue Max, 15 und 50 ml	Falcon
	Eppendorf, 1,5 ml	Eppendorf
Säulen:	Polypropylene-Econo-Columns	Biorad
	Glassäulen	Biorad
Filter:	Nitrozellulose:	Genescreen
		Koloniefilter
	Whatman Papier 3 mm Chr.	New England Nuclear Schleicher & Schüll Whatman
Pipetten + Spitzen:	Gilson-Pipetman	
	20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Dialyseschläuche:	Dialyse Membran 1-8X	Union Carbide Co., Chicago
Filmzubehör:	Polaroid-Kamera	Polaroid
	Filme dazu	Polaroid Professional
		667
	Röntgenfilme	Kodak X-OMAT (XAR 5)
	Filmkassetten	Rego, Okamoto

Filmentwickler

Agfa-Gevaert
Gevamatic 110**4.1.3. Kulturmedien****a) Ingredientien:**

Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Tryptone	Difco
Bacto Peptone	"
Nitrogen base w/o amino acids	"
Casaminosäuren	"
Bacto Agar	"
NZ-Amin A	Otto Aldag, Hamburg
Aminosäuren	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Tetracyclin	Fluka

b) Flüssigmedien für Bakterien

<u>LB- (=Luria-Bertani-) Medium:</u>	5 g/l	Yeast Extract
	5 g/l	NaCl
	10 g/l	Bacto-Trypton

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt und das Medium autoklaviert.

LB-amp.- (=LB mit Ampicillin):

Dieses Medium war wie LB zusammengesetzt, jedoch wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C noch 100 mg/l Ampicillin zugegeben.

<u>NZCYM-Medium:</u>	10 g/l	NZ-Amin-A (Typ A-Hydrolysat von Casein)
	5 g/l	NaCl
	5 g/l	Yeast-Extract
	2 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1 g/l	Casaminosäuren

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf 7.5 eingestellt.

2 x YT-Medium:

Dieses Medium wurde für die M13-Phagen-Infektion von E.coli JM 109 verwendet.

8 g/l	Bacto-Pepton
5 g/l	Yeast-Extract
5 g/l	NaCl

c) Flüssigmedien für Hefe

<u>YPD = Vollmedium:</u>	10 g/l	Bacto-Yeast-Extract
	20 g/l	Bacto-Peptide
	20 g/l	Dextrose

Zunächst wurden Yeast-Extract und Peptide eingewogen; dann wurde mit destilliertem Wasser auf 90 % des Endvolumens aufgefüllt. Gleichzeitig bereitete man eine 20%-Dextrose-Lösung vor. Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und erst nach Abkühlung konnte das Medium mit der Dextrose-Lösung ganz aufgefüllt werden, wonach es eine Konzentration an Dextrose von 2 % hatte.

Synthetisches Minimalmedium Leu⁻:

Es handelte sich hierbei um ein Medium, dem alle Aminosäuren ausser Leucin separat zugegeben wurden.

Zusammensetzung:

6,7 g/l	"Nitrogen base without amino acids"
20 mg/l	Adenin-Sulfat
20 "	Uracil
20 "	L-Tryptophan
20 "	L-Histidin
20 "	L-Arginin
20 "	L-Methionin
30 "	L-Tyrosin

30 mg/l	L-Isoleucin
30 "	L-Lysin-HCl
25 "	L-Phenylalanin
100 "	L-Glutaminsäure
100 "	L-Asparaginsäure
150 "	L-Valin
200 "	L-Threonin
375 "	L-Serin
20 g/l	Dextrose

"Nitrogen base without amino acids" wurde eingewogen und alle Aminosäuren aus Stammlösungen zupipettiert, ausser Asparaginsäure und Threonin. Das Medium wurde dann auf ca. 80 % seines Endvolumens mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Stammlösungen von Asparaginsäure und Threonin, sowie eine 20 % Dextrose-Lösung wurden separat autoklaviert. Anschließend wurde von diesen soviel zum Medium gegeben, bis die Endkonzentration erreicht war. Das Endvolumen konnte mit autoklaviertem Wasser eingestellt werden.

d) Kulturplatten

Dafür wurden dieselben Medien hergestellt wie unter b) und c) beschrieben, jedoch unter Zugabe von 15 g/l (Bakterien) oder 20 g/l (Hefe) Agar. Nach dem Autoklavieren war das Medium noch flüssig, bei 50°C konnten dann noch evtl. Antibiotika zugegeben werden. Das Medium wurde dann in Kulturschalen ausgegossen, wo es beim Abkühlen erstarrte. Folgende Platten-Typen wurden verwendet:

LB

LB amp.

Minimalmedium für JM 109 (

6 g/l	Na ₂ HPO ₄ ,
3 g/l	KH ₂ PO ₄ ,
0,5 g/l	NaCl,
10 g/l	NH ₄ Cl,
0,2 g/l	MgSO ₄ ,
100 µM	CaCl ₂ ,
2 g/l	Glucose)

YPD

Leu⁻

4.1.4. Allgemeine Puffer:

TE:	10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
	0,1 mM	EDTA
TBE:	0,089 M	Tris
	0,089 M	Borsäure
	0,002 M	EDTA
20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat, pH 7,0

4.1.5. Vektoren

Plasmide : a) für Bakterien

pSP 64	(Melton, 1984)
pBR 322	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
pUC 12	(Messing, 1983)
pUC 13	(Messing, 1983)

b) für Bakterien und Hefen ("shuttle vectors")

YEp 351	(Hill <i>et al.</i> , 1986)
---------	-----------------------------

Phagen: M13mp18 (Janisch-Perron *et al.*, 1985)

4.1.6. Bakterienstämme:

JM 109	(rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, mp E 44, rel A1, lambda ⁻ , delta (lac-pro AB), (F', tra D36, pro AB, lacI ^q ZdeltaM15) nach Janisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
JM 83	(ara, delta (lac-pro AB), rspL(=strA), Phi80, lacZ delta M15), nach Messing, 1979

4.1.7. Hefestämme:

DBY 746	(MAT alpha, his3-del1, leu2-3,
---------	--------------------------------

leu2-112, ura3-52, trp1-289, pet^- ,
 ρ^0), von Dr. Rödel, Institut für Genetik der
 Universität München

EJ 101 (alpha; trp 1, pro 1-126, ura 3-52,
 trp 1-289, pet^- , ρ^0)
 nach *Lin et al.* (1985)

4.2. Methoden

4.2.1. Allgemeine Methoden

4.2.1.1. Fällung von DNA und RNA mit Ethanol

DNA und RNA können aus einer wässrigen Lösung bei Anwesenheit von monovalenten Kationen mit Ethanol gefällt werden:

Zur Nukleinsäure-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.0 und 2 Volumina (DNA), bzw. 2,5 Volumina (RNA) Ethanol gegeben. Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz entweder über Nacht bei -20°C oder bis zum Erstarren bei -70°C aufbewahrt und der Niederschlag von DNA oder RNA daraufhin bei 10.000 bis 13.000 upm für 10 bis 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen, gegebenenfalls noch einmal abzentrifugiert und schließlich getrocknet. Er konnte daraufhin in Wasser oder dem gewünschten Puffer, meist TE, aufgenommen werden.

4.2.1.2. Phenolextraktion

Mit dieser Methode können aus einer Lösung, die Nukleinsäuren und Proteine enthält, selektiv und quantitativ Proteine entfernt, d. h. extrahiert werden. Sie besteht aus zwei

Schritten:

a) Extraktion mit Phenol-Chloroform ("Chloropane")

"Chloropane":	50	%	Phenol
	50	%	Chloroform
	0,05	%	8-Hydroxychinolin
gesättigt mit ANE-Puffer:	0,01	M	Natrium-Acetat
	0,1	M	Natrium-Chlorid
	0,001	M	EDTA

Herstellung: Das Phenol wurde in der entsprechenden Menge Chloroform unter Rühren gelöst, dann wurden das 8-Hydroxychinolin und der ANE-Puffer zugegeben, und das Ganze kräftig durchmischt. Nach erfolgter Phasentrennung konnte die untere Phase ("Chloropane") direkt zur Extraktion verwendet werden.

Extraktion: Zur wässrigen Nukleinsäure-Protein-Lösung (möglichst in TE oder anderem Puffer, nicht in reinem Wasser) wurde ein gleiches Volumen "Chloropane" gegeben, kräftig durchmischt und danach 2 bis 5 min abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und danach entweder nochmals der gleichen Prozedur unterworfen oder anschließend mit "Chloriso" (siehe b) extrahiert.

b) Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol ("Chloriso")

"Chloriso": Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1

Zur wässrigen Phase einer vorangegangenen "Chloropane" -Extraktion wurde ein gleiches Volumen "Chloriso" gegeben, kurz gemischt und abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde wieder abgenommen und mit Ethanol gefällt. Der "Chloriso"-Schritt ist notwendig, um evtl. Phenol-Reste zu entfernen, die später vorgesehene enzymatische Reaktionen stören würden.

4.2.1.3. Elektrophoretische Methoden

Um DNA- und RNA-Fragmente verschiedener Größe aufzutrennen, bedient man sich

gelelektrophoretischer Methoden: Sie beruhen darauf, daß sich geladene Moleküle im elektrischen Feld bewegen und, bedingt durch die Porengröße der gewählten Matrix, in der das geschieht, je nach Größe unterschiedlich gut vorankommen (Molekularsieb-Effekt).

Folgende Gelsysteme fanden Anwendung:

a) Nicht-denaturierende Agarose-Gele:

Mit dieser einfachen und schnellen Methode wurden DNA-Fragmente (in Ausnahmefällen auch RNA) proportional zum Zehnerlogarithmus ihres Molekulargewichts aufgetrennt, wobei der erfaßbare Größenbereich der DNA-Stücke je nach Agarose-Konzentration variierte. Für Standardgele wurde eine Konzentration von 1 % Agarose gewählt, womit sich DNA-Fragmente von ca. 300 bis 7000 bp Länge gut auftrennen ließen. Durch Anfärben mit dem fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnten sie sichtbar gemacht werden.

Gellösung:	1	%	Agarose
	1	x	TBE
	0,25	µg/ml	Ethidiumbromid
Laufpuffer:	1	x	TBE
Auftragspuffer:	30	%	Glycerin
	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol

Die Gellösung wurde im Mikrowellenherd aufgekocht, bis die Agarose geschmolzen war und danach in horizontale Plastikwannen (Biorad) ca. 0,5 cm dick gegossen. Ein Auftragstaschen-Kamm wurde an einem Ende bis fast zum Boden eingesteckt. Die Gelgröße und die Anzahl der Geltaschen variierte je nach den Erfordernissen (Minigel, 6 x 9 cm, mit 8 Taschen, oder 14 x 9 cm mit 20 Taschen; große Gele, 14 x 15 oder 20 oder 30 cm, mit 15 oder 20 Taschen; Taschen je nach Größe der Kammzähne mit einem Volumen zwischen 10 und 50 µl, Verbinden mehrerer Taschen durch Zusammenkleben der Zähne mit Tesa möglich). Nach Erstarren des Gels und Herausnehmen des Kamms wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer passender Größe gelegt und dabei ganz in Laufpuffer eingetaucht. Die DNA- oder RNA-Proben konnten nach Zugabe von 20 % v/v Auftragspuffer dann aufgetragen werden. Gelegentlich wurden sie vorher noch für 5 bis 10 min bei 65°C inkubiert, um eine besonders gute Auftrennung der Banden zu erreichen. Die Elektrophorese wurde bei 3 bis 10 V pro cm Elektrodenabstand durchgeführt; die Zeit

richtete sich nach den aufzutrennenden Fragmentgrößen. Wurde das Gel nach der Elektrophorese mit einer UV-Lichtquelle (254 nm) bestrahlt, wurden die DNA-Banden (gegebenenfalls auch RNA) sichtbar, in die sich der interkalierende Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid eingelagert hatte. Sie konnten so fotografiert werden; ein DNA-Längenmarker half bei der Größenbestimmung.

Eine Variante dieser Standard-Agarose-Gelelektrophorese, verwendete statt normaler Agarose eine sog. "Low-melting-agarose" (= LMA), die bei 65°C schmilzt, also unterhalb des Schmelzpunkts der meisten DNAs. Diese LMA wurde für die Auftrennung von DNA-Fragmenten hergenommen, die man später aus dem Gel eluieren oder direkt im Gel für Klonierungszwecke ligieren wollte.

b) Agarose-Gelelektrophorese von durch Glyoxal denaturierten Nukleinsäuren:

Diese Methode wurde für RNA (und DNA-Längenmarker) angewendet. Dabei wurden ebenfalls Agarose-Gele benutzt, allerdings in höheren Konzentrationen und in einem anderen Puffersystem. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit Glyoxal und Dimethylsulfoxid (DMSO) denaturiert.

Gellösung:	1,8	%	Agarose
	0,01	M	Natriumphosphat, pH 6,5
Laufpuffer:	0,01	M	Na-Phosphat, pH 6,5
Glyoxalierungs- lösung:	200	µl	DMSO
	70	µl	Glyoxal (vorher über Ionenaustauscher ge- reinigt)
	8	µl	10 % SDS
	8	µl	0,5 M Na-Phosphat, pH 6,5
	1	%	Bromphenolblau
Farbstoff:			

25 bis 50 µg Hefe-Gesamt-RNA oder 2 bis 4 µg poly-A⁺-RNA wurden einer Glyoxalierungsreaktion unterworfen, wobei die zugegebene Menge Glyoxalierungslösung abhängig war vom Volumen der eingesetzten RNA-Lösung. Mit dem DNA-Längenmarker wurde analog verfahren.

RNA-Lösung (µl)	Glyoxylierungslösung (µl)
5	10,8
10	21,7
15	32,6

Nach gutem Durchmischen folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 50°C, woraufhin jeder Ansatz mit 1 µl Farbstoff-Lösung versetzt und auf das Agarose-Gel aufgetragen wurde. Die Elektrophorese lief mindestens 6 h oder über Nacht bei ca. 2 V pro cm Elektrodenabstand. .

c) Denaturierende Acrylamid-Gele

Polyacrylamid-Gele dienen der Auftrennung kleiner DNA-Fragmente oder RNAs. Der Auftrennungsbereich ändert sich mit der Acrylamid-Konzentration. Folgende Konzentrationen wurden meist verwendet:

% Acrylamid	Auftrennungsbereich (Nukleotide)
5	80 - 500
8	60 - 400
12	40 - 200
16	20 - 150
	(nach Maniatis et al., 1982)

Mit diesen Gelen können Fragmente mit einer unterschiedlichen Länge von nur einem Nukleotid voneinander getrennt werden.

Zur Herstellung der Gele wird Acrylamid mit dem bifunktionellen N,N'-Methylenbisacrylamid (kurz Bisacrylamid) kopolymerisiert, wobei die Konzentration und das Verhältnis der beiden Substanzen zueinander die Porengröße des Gels bedingt. Die Polymerisation wird durch Redox-Systeme katalysiert, hier durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zusammen mit Ammoniumperoxodisulfat ((NH₄)₂S₂O₈, kurz APS). Zur Denaturierung der aufzutrennenden Proben wird Harnstoff zur Gellösung gegeben.

Gellösung (Standard):	x	%	Acrylamid (A. : Bisa. = 29 : 1)
Starter:	0,1	%	TEMED

	0,05	%	APS
Laufpuffer:	1	x	TBE
Auftragspuffer:	90	%	Formamid
	1	x	TBE
	0,02	%	Bromphenolblau
	0,02	%	Xylencyanol

Die Gellösung wurde nach Zugabe der Starter schnell zwischen zwei Glasplatten gegossen, ein Auftragstaschen-Kamm eingeschoben und bis zur fertigen Auspolymerisation dort belassen. Die Geldicke betrug entweder 0,3 mm (analytische Gele) oder 1,5 mm (präparative Gele). Die Gelbreite war 20 cm, und die Länge betrug 20, 25 oder 40 cm. Nach dem Auspolymerisieren wurde es vertikal oben und unten je an einen Pufferbehälter angeschlossen. Es wurde Strom angelegt, und die Vorelektrophorese (zum Entfernen von Verunreinigungen) bei der auch später benötigten Stromstärke für ca. 15 bis 30 min durchgeführt. Danach konnten die Proben, die entweder in Auftragspuffer nach dem Fällern aufgenommen oder mit mindestens 30 % Auftragspuffer versetzt und 1 bis 3 min gekocht worden waren, aufgetragen werden, nicht ohne jedoch zuvor die Auftragstaschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült zu haben. Die Elektrophorese wurde gewöhnlich bei 25 bis 30 mA durchgeführt, was je nach Geldicke und -länge unterschiedliche Spannungen ergab. Das bewirkte eine ausreichende Wärmeentwicklung, um die Denaturierung der Proben zu gewährleisten, und führte noch nicht zum Springen der Glasplatten, die zur gleichmäßigeren Wärmeverteilung mit Metallplatten zusammengeklammert wurden. Nach der Elektrophorese wurde eine Glasplatte abgenommen, und das Gel auf der anderen belassen und mit einer Haushaltsfolie überzogen. Die DNA- und RNA-Banden wurden entweder durch Autoradiographie (bei radiomarkierten Proben) oder durch "UV-Shadowing" (nicht markierte Proben, aber nur in größeren Mengen) sichtbar gemacht.

e) Native Acrylamid-Agarose-Gele = "Composite Gels"

siehe 4.2.16. Nachweis von Spleißkomplexen

4.2.1.4. Identifizierung von Banden auf Gelen und Filtern

a) Autoradiographie

³²P- und ³⁵S-markierte DNA- oder RNA-Spezies, die auf Gelen aufgetrennt wurden, sowie unmarkierte Moleküle, die auf Filter transferiert und dort mit radioaktiven Proben

hybridisiert wurden, konnten durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Gele oder Filter in Haushaltsfolie eingepackt und in gut verschließbaren Filmkassetten unter Verwendung von Röntgenfilmen und Verstärkerfolien bei -70°C exponiert. Die Exponierzeit konnte je nach Strahlungsstärke eine Minute bis mehrere Tage betragen.

b) Fluoreszenzlöschung "UV-Shadowing"

Wenn DNA oder RNA in ausreichender Menge (einige μg) auf einem Gel oder Filter vorhanden waren, konnten die Banden auch durch schräges Beleuchten mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden auf eine Dünnschichtplatte mit UV-Indikator gelegt, deren Fluoreszenz-Strahlung an der Position der Banden von den Nukleinsäuren absorbiert wurde.

c) Ethidiumbromid-Färbung

siehe unter 4.2.1.3.

4.2.1.5. Reinigen von Oligodeoxynukleotiden

Oligodeoxynukleotide wurden von Dr. R. Mertz und seinen Mitarbeitern in diesem Institut synthetisiert. Sie wurden dort nach dem Deoxynukleosid-Phosphoramidit-Verfahren (*Beaucage und Caruthers*, 1981) mit Hilfe eines "DNA- Synthesizers" (Applied Biosystems, Modell 300/381) hergestellt.

Die Roholigodeoxynukleotide mußten anschließend gelelektrophoretisch gereinigt werden, was mittels eines präparativen, denaturierenden 16 % Polyacrylamidgels (29:1) geschah. Die Oligodeoxynukleotid-Bande konnte mit "UV-Shadowing" lokalisiert und ausgeschnitten werden, woraufhin das Oligodeoxynukleotid über Nacht bei 37°C in H_2O eluiert wurde. Nach Umfällen, Phenolextraktion und nochmaligem Fällen war es geeignet zur weiteren Verwendung.

4.2.1.6. Anzucht von Bakterien, Phagen, Hefen

Bakterien und Hefen wurden mit einer Impföse jeweils im entsprechenden Medium angeimpft, manchmal zuerst in einer Vorkultur von 5 bis 20 ml, die dann am nächsten Tag zu einem größeren Volumen Medium gegeben wurde (Hauptkultur). Für große Plasmidpräparationen wurden 200 ml Bakterienkultur (stationäre Phase) für Minipräparationen 5 ml benötigt. Für Hefe-Spleiß-Extrakte brauchte man 1 l Kultur (OD 2 - 4; 1 OD entspricht ca. 5×10^6 Zellen), für DNA-Präparationen 50 ml und für RNA-Präparationen 100 ml. Im letzten Fall wurden rekombinante Hefeklonen in Minimalmedium (Leu⁻) 2 Tage lang herangezogen, dann abzentrifugiert, wieder in gleicher Menge (100 ml) Vollmedium YPD aufgenommen und nochmals 2 Generationszeiten (4 - 5 h) inkubiert. Die Inkubation erfolgte in allen Fällen im Schüttelinkubator bei 37°C (Bakterien) oder 30°C (Hefen). Die Inkubationszeiten variierten zwischen 6 h (Bakterienminipräp.) und 2 Tagen (Hefe-RNA-Präp.).

M13-Phagen können nur Bakterienstämme transfizieren, die Pili ausbilden können und dazu den F-Faktor oder Sex-Faktor besitzen müssen. JM 109 ist so ein Stamm. Sein episomaler F'-Faktor (F', da er Teile des Bakterienchromosoms besitzt) trägt das Wildtyp-allel proA+B+, das eine entsprechende chromosomale Deletion delta pro komplementiert. Wird der Stamm in einem Prolin-Mangelmedium vermehrt, behält er den F'-Faktor. Zur Phagentransfektion werden die Zellen unter vorsichtigem Schütteln im Medium YT herangezogen, damit die Pili, die die Phagen zum Anheften benötigen, nicht abbrechen.

Phagenplaques, die gut isoliert auf einer Platte im Softagar liegen, wurden mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 1 ml NZ-Medium gegeben, worin sie 30 min bei RT Zeit hatten, aus dem Softagar heraus zu diffundieren. Die Phagensuspension von 2 Plaques wurde dann zu 200 ml einer Bakteriensuspension des E.coli Stamms JM 109 gegeben, die bereits - während schonender Schüttelinkubation - bei 37°C eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht hatte. Die Inkubation wurde dann noch 5 h bei 37°C fortgesetzt, wonach sowohl die E. coli-Zellen, die doppelsträngige Phagen-DNA enthielten, als auch Phagen mit einzelsträngiger DNA aus dem Kulturmedium geerntet werden konnten.

Längerfristige Aufbewahrung von Bakterien, Hefen, sowie Phagen:

Platten: Bakterien- und Hefestämme wurden auf Agar-Platten, die das erforderliche Medium enthielten, ausgestrichen und 1 Tag inkubiert; die Platte wurde dann mit Parafilm

luftdicht verschlossen und bei 4°C aufbewahrt (4-8 Wochen). Phagen: 20 µl einer Phagensuspension - es empfehlen sich verschiedene Verdünnungen in NZ - wurden mit 80 µl Bakteriensuspension ($OD=0,5$, entspricht ca. $0,5 \times 10^8$ Zellen) und 3 ml flüssigem H-soft-Agar (42°C) vermischt und schnell auf NZ-Platten ausgebracht. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht waren bei geeigneter Verdünnung deutlich separate Plaques im Bakterienrasen zu sehen.

DMSO-Flüssigkulturen: Übernachtskulturen von Bakterien oder Hefen wurden 1 : 50 verdünnt und nochmal 1 h inkubiert. Dann wurden je 1 ml davon mit 90 µl DMSO versetzt und schnell bei -70°C eingefroren.

Glycerin-Flüssigkulturen: 1 ml einer Übernachtskultur wurde mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % versetzt und schnell bei -70°C eingefroren und aufbewahrt.

In den beiden letzten Fällen sind sowohl Bakterien als auch Hefen monatelang oder gar jahrelang haltbar. Sie können direkt aus der -70°C-Kultur mit einer Impföse auf Platte ausgestrichen oder in Flüssigkultur angeimpft werden.

4.2.2. Restriktionsspaltungen

Restriktionsenzyme vom Typ II spalten den DNA-Doppelstrang an bestimmten Stellen, die durch Erkennungssequenzen festgelegt sind (Roberts, 1982). Sie gehören zu einem Restriktions/Modifikations-System von Bakterien, das aus zwei getrennten Enzymen besteht: Ihnen selbst und entsprechende Methylasen, die die DNA an derselben Erkennungssequenz modifizieren. Dieses System stellte einen Schutzmechanismus der Zelle dar, durch den Fremd-DNA, die nicht an den Erkennungssequenzen methyliert ist, geschnitten und unschädlich gemacht werden soll. Restriktionsenzyme vom Typ II besitzen für die Molekularbiologie großen Wert, da mit ihnen DNA ganz spezifisch an definierten Sequenzen gespalten werden kann (mit oder ohne überhängende Enden). Das bringt sowohl analytischen Nutzen (z.B. Restriktionskartierung), als auch präparativen (Klonierung von bestimmten DNA-Abschnitten: Ligation von Fragmenten mit homologen Schnittstellen).

Standardpuffer:

<u>Salz-</u>	<u>NaCl</u>	<u>Tris-HCl</u>	<u>MgCl₂</u>	<u>DTT</u>
<u>konzentration:</u>		<u>(pH 7,5)</u>		
niedrig	-	10 mM	10 mM	1 mM
mittel	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
hoch	100 mM	10 mM	10 mM	1 mM

Universal-Restriktionspuffer (URP):

33 mM	Tris-HCl, pH 7,9
66 mM	Kaliumacetat
10 mM	Magnesiumacetat
0,5 mM	DTT
0,1 mg/ml	BSA

ScaI-Puffer:

100 mM	NaCl
6 mM	Tris-HCl, pH 7,4
6 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
0,1 mg/ml	BSA

Die gewünschte Menge DNA (analytisch: < 1 µg; präparativ: bis 100 µg) wurde mit dem oder den benötigten Restriktionsenzymen (1 - 10 U/µg DNA) bei 37°C in einem Volumen gespalten, das mindestens 10 mal höher als das eingesetzte Enzym-Volumen sein sollte, da der Glyceringehalt im Reaktionsgemisch 5 % nicht übersteigen sollte, und Enzyme mit 50% Glycerin stabilisiert geliefert werden. Meist genügte eine Reaktionszeit von 1 h, um quantitative Spaltung zu erhalten, selten mußte über Nacht inkubiert werden. Der Reaktionsverlauf konnte durch Aliquot-Entnahmen und deren gelelektrophoretischer Analyse überprüft werden. Nach der Spaltung konnte entweder der gesamte Ansatz ohne weitere Behandlung auf Agarose- oder LMA-Gele aufgetragen werden, oder er wurde Phenol-extrahiert (zur Entfernung des Enzyms) und gefällt.

4.2.3. Radioaktive Markierung von Hybridisierungsproben

4.2.3.1. Nick-Translation von Plasmiden

Mit dieser Methode (nach *Rigby et al.*, 1977) können Plasmide gleichmäßig radioaktiv markiert werden. Sie bedient sich der 5'-3'-Polymerase- und gleichzeitigen 5'-3'-Exonuklease-Aktivität von DNA-Polymerase I aus *E. coli*, die einen von DNase gesetzten "Nick" (Spaltung einer Phosphodiesterbindung an einem Strang von doppelsträngiger DNA) an der DNA entlang bewegen (translatieren) kann, indem sie gleichzeitig Nukleotide vom 5'-Ende des Nicks herauschneidet und neue am 3'-Ende einbaut. Dabei kann eines der neu eingebauten Nukleotide, z.B. dCTP, radioaktiv markiert werden.

20 µl-Ansatz:	25 µg/ml	DNA
je	30 µM	3 verschiedene dNTPs (unmarkiert)
		(z.B. dATP, dGTP, dCTP)
	7 µM	ATP
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	10 mM	MgSO ₄
	0,1 mM	DTT
	50 µg/ml	BSA
	3,75 µM	alpha- ³² P-dNTP, z.B. alpha- ³² P-dCTP
		(=3 mCi/ml)
		(spez. Aktivität 800 Ci/mmol)
	0,005 U/ml	DNase I
	100 U/ml	DNA-Polymerase I

Der Ansatz wurde 2 h bei 15°C inkubiert und dann 2 min gekocht. Die markierte DNA wurde von nicht inkorporierten Nukleotiden über eine Biogel A5m-Säule (Molekülsieb) abgetrennt. Dabei wurde eine Glas-Pasteur-Pipette am Übergang vom großen zum kleinen Durchmesser mit Glaswolle so verstopft, daß das Säulenmaterial zurückgehalten wurde. Dann wurde sie mit dem Gel bis knapp unter den Rand aufgefüllt und mit 5 ml TE gewaschen. Daraufhin trug man die Probe direkt nach dem Kochen auf und eluierte sie in 20 Fraktionen á 100 µl, wobei das Plasmid im ersten Radioaktivitätsgipfel (ca. Fraktion 7 bis 12) auftaucht, und das nicht eingebaute alpha-³²P-dCTP erst in einem späteren Gipfel. Nur die kleinen Moleküle werden hier von den Poren der Matrix aufgenommen und so länger zurückgehalten als die großen.

4.2.3.2. Modifizierte Nick-Translation von DNA-Fragmenten

Diese Methode (nach *Feinberg und Vogelstein*, 1984) bedient sich der 5'-3'-Polymerase-Aktivität der großen Untereinheit von DNA-Polymerase I aus *E.coli*, des sog. Klenow-Fragments, und benötigt keine DNase. Statt dessen werden DNA-Fragmente im LMA-Gel denaturiert; ihnen wird ein Zufallsgemisch von Hexanukleotiden zugegeben, die z.T. an die DNA-Einzelstränge hybridisieren und von der Klenow-Polymerase komplementär zur Matrize des Einzelstrangs und unter Einbau neuer Nukleotide (darunter ein radioaktiv markiertes) verlängert werden.

50 µl -Ansatz:

max.bis	65	%	Gellösung mit DNA-Fragment (ca.10-50 ng/Ansatz)
	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	5	mM	MgCl ₂
	0,07	%	2-Mercaptoethanol
je	20	µM	dATP, dTTP, dGTP
	200	mM	Hepes, pH 6,6
	120	µM	"Random Hexanucleotides"
	40	µg/ml	BSA
	1,25	µM	alpha- ³² P-dCTP (800 Ci/mmol)
	20	U/ml	Klenow-Polymerase

Die DNA wurde auf einem LMA-Gel aufgetrennt, das ausgeschnittene Gelstück mit dem gewünschten Fragment 1 : 3 mit H₂O verdünnt, 5 min gekocht und auf 37°C abgekühlt; dann konnte die gewünschte Menge der DNA-Gellösung zum obigen Ansatz gegeben werden. Er wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde, wie unter a) beschrieben, das markierte Fragment mittels Gelfiltration gereinigt.

4.2.3.4. 5'-Markierung von Oligodeoxynukleotiden

Dabei kommt das Enzym T4-Polynucleotid-Kinase aus T4-infizierten *E.coli* zum Einsatz. Es überträgt eine gamma-Phosphat-Gruppe von ATP (in diesem Fall radioaktiv markiertem gamma-³²P-ATP) auf ein freies 5'-Hydroxyl-Ende von DNA (auch für RNA möglich). Oligodeoxynukleotide besitzen am 5'-Ende nur eine Hydroxylgruppe, müssen also vorher nicht dephosphoryliert werden, und werden mit dieser Methode sehr effizient radioaktiv

markiert.

15 µl-Ansatz:	200	ng/Ansatz	Oligodeoxynukleotid
	50	mM	Tris-HCl, pH 7,6
	10	mM	MgCl ₂
	5	mM	DTT
	0,1	mM	Spermidin
	1	mM	EDTA
	2,2	µM	gamma- ³² P-ATP (3000 Ci/mmol)
	2 x 5	U/ml	Polynukleotid-Kinase

Während der 40-minütigen Inkubation bei 37°C wurde zweimal Enzym zugegeben (Zeitpunkt 0 und 20 min). Danach wurde das markierte Oligodeoxynukleotid mittels Säulenchromatographie auf einer DEAE-Säule von nicht eingebautem gamma-³²P-ATP getrennt.

<u>Lösungen:</u>	<u>0,2 M NTE: Äquilibrieren, Waschen</u>	<u>0,5 M NTE: Eluieren</u>
Tris-HCl, pH 7.5	10 mM	10 mM
EDTA	0,1 mM	0,1 mM
NaCl	0,2 M	0,5 M

200 µl des Säulenmaterials (DEAE-Biogel A) wurden mit 5 ml 0,2 M NTE äquilibriert. Dann wurde der Kinase-Ansatz mit 85 µl 0,2 M NTE versetzt, 2 min gekocht, auf die Säule aufgetragen, und diese nochmals mit 5 ml 0,2 M NTE gewaschen (Entfernen von überschüssigem gamma-³²P-ATP). Das markierte Oligodeoxynukleotid wurde in 10 Fraktionen á 200 µl mit 0,5 M NTE eluiert.

4.2.3.5. Herstellen eines radioaktiv markierten DNA-Längenmarkers

Diese Methode arbeitet nach demselben Prinzip wie die Oligo-Kinasierung. Nur muß nach der Restriktionsspaltung der Spaltansatz noch mit Phosphatase behandelt werden, um die Phosphatgruppen von den 5'-Enden der DNA-Fragmente zu entfernen und freie, kinasierbare OH-Gruppen dort zu erhalten.

200 µl-CIP-Reaktionsansatz: CIP = Calf Intestine Alkaline Phosphatase

ca. 10 µg/ml	gespaltene DNA
50 mM	Tris-HCl, pH 9.0
1 mM	MgCl ₂
0,1 mM	ZnCl ₂
1 mM	Spermidin
2 x 0,01 U pro 1 pmol freie	
5'-Enden von DNA	CIP

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h und zum Zeitpunkt 0 und 30 min wurde jeweils Enzym dazu gegeben. Anschließend mußte der Ansatz sorgfältig phenolextrahiert werden (ca. 4 x), um letzte Reste von CIP zu entfernen, und wurde dann gefällt. Ca. 200 ng der so behandelten DNA konnten dann wie unter c) beschrieben mit gamma-³²P-ATP und Kinase am 5'-Ende ³²P-markiert werden und dienten dann als radioaktiver Marker. Verwendet wurden pBR 322, mit Hpa II geschnitten, und phiX174 mit HaeIII geschnitten.

4.2.4. Klonierungen

Um Bakterien und Hefen mit fremder DNA zu transformieren, benötigt man Vektoren (Plasmide oder Phagen) als Vehikel. Vektoren können im Wirtstamm vermehrt werden und werden an die Tochterzellen weitergegeben. Dazu müssen sie Sequenzen enthalten, die als Replikationssignale wirken ("Origin of Replication" = ori bei bakteriellen Plasmiden, 2µ-Sequenzen bei Hefe-Vektoren), und ausserdem Selektionsmarkergene, die es erstens erleichtern, transformierte Zellen zu identifizieren, und die zweitens verhindern, daß die Vektoren bei der Zellvermehrung verloren gehen (z.B. Ampicillinresistenzgen Ap^R für E.coli-Vektoren, Leu2-Gen für Hefe-Vektoren). Mit den Vektoren transformiert man geeignete Wirtsstämme (z. B. Bakterien, die kein Ampicillin-Resistenzgen besitzen, oder Hefen, denen ein essentielles Gen für den Leucin-Stoffwechsel fehlt). Man selektiert dann auf transformierte Zellen, indem man sie in einem Selektionsmedium (z. B. LB-amp oder Leu⁻) wachsen läßt, das nur solchen eine Überlebenschance gibt, die einen Vektor mit dem Selektionsgen enthalten. In solche Vektoren nun kann man Fremd-DNA einbringen: Man öffnet den Vektor *in vitro* mit 1 oder 2 geeigneten Restriktionsenzymen, wobei die Erkennungssequenz dafür oft in einer sog. Polylinker-Region des Vektors liegt, die

mehrere, nur einmal vorkommende Erkennungssequenzen für jeweils verschiedene Restriktionsenzyme aufweist. Fremd-DNA-Fragmente, die komplementäre Enden besitzen können nun in den Vektor mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase kovalent über Phosphodiester-Bindungen integriert werden. T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung eines 3'-Hydroxyl- mit einem 5'-Phosphat-Ende. Mit diesem rekombinanten Vektor werden dann geeignete Wirtsstämme transformiert, d. h. er wird in Wirtszellen, die dazu vorher "kompetent" gemacht wurden, eingebracht und liegt dort im Cytoplasma als Episom vor.

4.2.4.1. Spaltung von Vektoren und Bereitstellung von Fragmenten

Die DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spezifisch gespalten. Handelte es sich bei der zu klonierenden DNA um ein Fragment, das an beiden Enden mit demselben Enzym geschnitten worden war, so mußte der Vektor mit demselben Enzym an nur einer Stelle geöffnet werden. Dabei empfahl es sich, ihn danach noch mit Phosphatase zu behandeln, die von den 5'-Enden die Phosphatgruppen entfernt, um eine Rezirkularisierung des Vektors bei der späteren Ligation zu verhindern. Dazu wurde kein eigener CIP-Ansatz (siehe 4.2.3.5.) benötigt, sondern nach quantitativer Spaltung des Vektors (durch gelelektrophoretische Auftrennung von Aliquots kontrolliert) konnte ca. 1U CIP pro µg DNA direkt zum Restriktions-Ansatz gegeben werden, und dieser wurde ca. 2 bis 30 min bei 37°C inkubiert. Eine solche CIP-Behandlung empfahl sich auch manchmal, wenn die Klonierung über zwei verschiedene Spaltstellen vorgenommen wurde, und zwar bei sog. "Shot-gun"-Klonierungen. Dabei wurden komplette Spaltansätze sowohl des Vektors als auch der DNA, aus der das zu klonierende Fragment herausgeschnitten wurde, zusammen gegeben. Um eine Religation der Ausgangskonstrukte zu minimieren, wurde der Vektor-Spaltansatz komplett mit CIP behandelt, die andere DNA wurde in einem ausserhalb des Fragments liegenden Bereich möglichst mit einem weiteren Restriktionsenzym nachgeschnitten, was besonders wirkungsvoll war, wenn das Enzym keine überhängenden Enden, sondern stumpfe Enden schnitt, die von der Ligase seltener verknüpft werden. Wurden Vektoren und Fragmente, die mit zwei Enzymen geschnitten worden waren, später aus einem Gel eluiert, fielen solche Vorsichtsmaßnahmen weg. Nur in diesem Fall war keine sorgfältige Phenolextraktion und Fällung der Reaktionsansätze nach Spaltung und Dephosphorylierung nötig. Sie konnten direkt aufs Gel aufgetragen werden.

4.2.4.2. Fragmentisolierung

Wenn keine "Shot-gun"-Klonierungen vorgenommen wurden, mußten geschnittene Fragmente und auch Vektoren aus Agarose- oder LMA-Gelen isoliert werden, was eine vorherige Gelelektrophorese voraussetzte:

Verwendung des Fragments in LMA:

Bei Verwendung von LMA-Gelen mußte nach erfolgter Auftrennung das Gelstück mit dem gewünschten Fragment möglichst knapp ausgeschnitten werden (nur für kleine DNA-Mengen geeignet; das Gelvolumen sollte nicht zu groß sein, sondern höchstens 20 - 30 µl betragen). Das Gelstück wurde mit dem dreifachen Volumen H₂O versetzt und 5 bis 10 min bei 65°C geschmolzen. Die DNA-Gel-Suspension konnte nach Abkühlen auf 37°C noch pipettiert und direkt zur Ligation eingesetzt werden. Diese Methode funktionierte allerdings nur bei relativ unkomplizierten Klonierungen.

Phenolextraktion von DNA-LMA-Gemischen:

LMA-Stücke mit DNA-Fragmenten wurden mindestens 1 : 5 mit H₂O versetzt und bei 65°C geschmolzen. Nach Abkühlen auf 37°C konnte die Agarose zweimal mit geschmolzenem Phenol (äquilibriert mit TE, pH 8,0) und anschließend mit "Chloropane" und "Chloriso" extrahiert werden. Damit wurde die Agarose aus der Lösung entfernt. Die verbleibende DNA wurde gefällt.

Elektroelution:

In einer Elutionskammer (Schleicher & Schüll) wurden zwei Filter so angebracht, daß sich zwischen ihnen ein abgetrennter Raum mit einem Volumen von ca. 400 µl ergab. Der Filter näher zum Plus-Pol ließ nur den Ionenstrom durch, der näher zum Minus-Pol dagegen war für DNA durchlässig. Vor ihn wurde das Gelstück (meist Agarose, nicht LMA) mit dem DNA-Fragment placiert, das ganze in Elektrophoresepuffer TBE getaucht und Strom angelegt. Die DNA wanderte im elektrischen Feld aus dem Agaroseblock heraus durch die erste Membran hindurch und blieb an der zweiten Membran hängen. War die Elution, die bei 60 V pro 10 cm Elektrodenabstand durchgeführt wurde, beendet (je nach Größe des Fragments unterschiedlicher Zeitbedarf; konnte nur anhand der Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ungefähr abgeschätzt werden), wurde der Strom für ca. 20 sek umgepolt, um die DNA von der zweiten Membran abzulösen. Sie befand sich dann in dem kleinen Kompartiment zwischen den Membranen und konnte dort herauspipettiert werden. Nach "Chloropane"- und "Chloriso"-Extraktion konnte sie weiter

verwendet werden.

4.2.4.3. Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren durch Ligation

Um DNA-Fragmente in Vektoren (Plasmide oder Phagen) einzuführen, bedient man sich des Enzyms T4-DNA-Ligase aus T4-infizierten *E. coli*-Zellen, das freie 3'-OH-Enden und 5'-Phosphat-Enden von DNA miteinander verknüpft.

Zunächst mußte das Verhältnis berechnet werden, in dem man Vektor und Fragment zusammengeben wollte. Meist wurde das Fragment in einem dreifachen molaren Überschuß zum Vektor eingesetzt. Die relativen Konzentrationen der zu ligierenden DNA-Vektoren und Fragmente wurden über Gelelektrophorese bestimmt. Der Ligationsansatz wurde in der Regel in einem Volumen von 10 bis 20 µl bei 4°C inkubiert, manchmal auch in einem größeren, wenn nämlich DNA-Fragmente in LMA verwendet wurden, dann allerdings bei 12°C. In beiden Fällen erfolgte die Inkubation über Nacht. Eingesetzt wurden dazu meist eine DNA-Menge von 200 bis 500 ng und eine Enzymmenge von 200 - 400 U T4-DNA-Ligase. Die Reaktion erfolgte in 1 x Ligase-Puffer.

5 x Ligase-Puffer:	330 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	50 mM	MgCl ₂
	5 mM	EDTA
	1 mM	ATP
	50 mM	DTT

Wurde die Klonierung über nur eine Schnittstelle vorgenommen, ließ man die Reaktion erst 30 min bei RT erfolgen, verdoppelte dann das Reaktionsvolumen durch Pufferzugabe, gab erneut Enzym zum Gemisch und inkubierte dann, wie sonst auch, bei 4°C bzw. 12°C über Nacht. Diese Volumenvergrößerung sollte das Reaktionsgleichgewicht von einer intermolekularen hin zu einer intramolekularen Ligation von DNA-Enden verschieben. Parallel wurde nach den gleichen Bedingungen auch ein Religationsgemisch mit dem geschnittenen und phosphatasebehandelten Vektor allein zur Kontrolle angesetzt, um den Hintergrund an intramolekularer Reaktion des Vektors festzustellen.

4.2.4.4. Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

a) Transformation von Bakterienzellen (nach Hanahan, 1983):

Für die Transformation wurden die Bakterienstämme JM 109 und JM 83 verwendet.

Versuchsdurchführung für frische kompetente Zellen:

Mit einer Übernachtskultur des betreffenden Stammes wurde NZ-Medium 1:50 angeimpft und ca. 1,5 h bei 37°C inkubiert, bis die Zellsuspension eine OD von ca. 0,5 (bei 600 nm auf Corning-Colorimeter 252, entspricht Zelldichte von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml) erreicht hatte. Pro Transformationsansatz benötigte man 4 ml Ausgangskultur. Die Zellen wurden 10 min bei 3000 upm und 4°C abzentrifugiert, in 1/3 des Ausgangsvolumens in TFB-Puffer resuspendiert und 10 bis 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden sie erneut abzentrifugiert (s.o.) und anschließend sehr vorsichtig in 1/20 des Ausgangsvolumens in TFB resuspendiert. Dann folgten drei Schritte, bei denen pro Transformationsansatz (= 200 µl Zellsuspension in TFB) abwechselnd je 7 µl frisches DMSO, 7 µl DTT-Lösung und nochmals 7 µl frisches DMSO zugegeben wurden. Dazwischen wurden die Zellen jeweils min (nach DMSO-Zugabe) oder 10 min (nach DTT-Zugabe) auf Eis belassen.

TFB-Puffer:	10 mM	K-MES, pH 6,2
	100 mM	RbCl
	45 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	3 mM	HACoCl ₃ (Hexaminkobaldchlorid)

DMSO: von Fluka (puriss. p. a.)

DTT-Lösung:	2,25 M	DTT
	40 mM	K-Acetat, pH 6,0

Nach diesen Schritten konnte zu den nun kompetenten Zellen, die in 220 µl-Aliquots für die einzelnen Transformationsansätze aufgeteilt worden waren, die DNA gegeben werden, mit der sie transformiert werden sollten. Dabei handelte es sich entweder um Plasmide in TE (ca. 100 pg pro Ansatz) oder um Ligationsansätze (ca. 200 ng DNA pro Ansatz), wobei das Volumen möglichst nicht größer als 10 µl sein sollte. Die Zellen blieben dann weitere 30 min auf Eis. Es folgte der sog. "Hitzeschock", bei dem die Zellen 90 sek lang bei 42°C inkubiert wurden. Jetzt gab man zu jedem Ansatz 800 µl LB und inkubierte ihn bei 37°C 1h lang. Nach dieser Zeit hatten die Zellen sich soweit erholt, daß sie auf Selektionsplatten

(meist LBamp) ausplattiert werden konnten, wo nur Transformanden Kolonien ausbilden sollten, die im Besitz eines Resistenzgens, z. B. Ap^R waren.

Versuchsdurchführung für einzufrierende kompetente Zellen:

Bei der Präparation kompetenter Zellen, die bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden sollten, war das Vorgehen ähnlich, abgesehen von einigen Änderungen: Es wurde statt dem TFB-Puffer der Puffer FSB verwendet. Es wurde kein DTT zugegeben und nach dem zweiten DMSO-Schritt wurden die Zellen schnell in CO_2/EtOH eingefroren und danach bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Bei Bedarf konnten sie auf Eis aufgetaut werden. Das weitere Verfahren entsprach dem oben geschilderten.

FSB-Puffer:	10 mM	K-Acetat, pH 7,0
	100 mM	KCl
	45 mM	MnCl_2
	10 mM	CaCl_2
	3 mM	HACoCl_3
	10 %	Glycerin
pH auf 6,4 einstellen!		

Die erzielten Transformationsraten betrugen pro $1\ \mu\text{g}$ eingesetztes Kontrollplasmid (pUC13) 10^7 bis 10^8 Klone für frische kompetente Zellen und etwa eine Zehnerpotenz weniger für eingefrorene.

b) Transformation von Hefezellen:

Hefe wurde nach der Alkali-Methode (modifiziert nach Ito, 1983) mit sog. "Shuttle-Vektoren" transformiert; diese enthalten sowohl Sequenzen zur Vermehrung in *E. coli*, als auch solche zur Vermehrung in *Saccharomyces cerevisiae*. Die gewünschten Fremd-DNA-Sequenzen werden über Klonierungsschritte in *E. coli* in den Vektor eingebracht. Bei dieser Methode werden die Hefezellen mit monovalenten, Alkali-Kationen behandelt, was Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA induziert.

Transformationspuffer 1:

1 mM	EDTA
10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
100 mM	Lithiumacetat, in TE, pH 7,5

Transformationspuffer 2:

40 %	PEG 4000
100 mM	Lithiumacetat, in TE, pH 7,5

Durchführung:

Pro Transformationsansatz wurden 20 ml einer Zellsuspension benötigt, die bei 30°C in YPD-Medium bis zu einer OD bei 600 nm von 1,0 ($=5 \times 10^6$ Zellen/ml) herangewachsen war. Die Zellen wurden nach dem Abzentrifugieren (5 min, 3500 upm, 4°C) einmal in TE, pH 7,5, gewaschen, wieder abzentrifugiert, einmal in Transformationspuffer 1 gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Nun wurden sie in 1/200 des Ausgangsvolumens (100 µl pro 20 ml Zellsuspension) Transformationspuffer 1 aufgenommen, in 100µl-Portionen aliquotiert und 1 h bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde Plasmid-DNA dazugegeben, wobei die Menge in verschiedenen Parallelansätzen variiert wurde (ca. 0,5 bis 2,5 µg pro Ansatz). Es folgte eine erneute Inkubation von 30min bei 30°C. Dann wurden je 700 µl Transformationspuffer 2 dazugegeben, und die Inkubation 1h fortgesetzt. Schließlich wurden die Zellen für 5 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, woraufhin sie auf Selektionsplatten (hier Leu⁻) ausplattiert werden konnten. Da der gewählte Hefestamm zwei Punktmutationen im Leu2-Gen besitzt, konnten nur Zellen, denen das intakte Gen auf dem Shuttle-Vektor zur Verfügung gestellt wurde, auf Platten mit Minimalmedium ohne Leucin wachsen. Erst nach 2 bis 4 Tagen waren die ersten Kolonien erkennbar. Die Transformationsausbeute war recht gering, pro µg DNA 20 bis 500 Kolonien.

4.2.4.5. Transformation von E. coli-Bakterien mit Phagen-DNA

Im Prinzip wurde die Transformation von JM 109-Bakterienzellen mit zirkulärer, doppelsträngiger M13-Phagen-DNA nach der gleichen Methode durchgeführt wie die Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA. Nur wurden die Transformationsansätze nicht wie dort am Ende auf Selektionsplatten ausplattiert, sondern verschieden große Aliquots von ihnen wurden mit jeweils 3 ml warmem H-Top-Agar (42°C) vermischt und schnell auf NZ-Platten (ohne Antibiotika-Zusatz) ausgebracht, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Die Phagen-Plaques im Bakterienrasen waren am nächsten Tag gut sichtbar.

4.2.5. Identifizierung von positiven Transformanden ("Screening")

Durch "Screening" der Transformanden versucht man, unter den nach einer Transformation oder Transfektion erhaltenen Klonen (Bakterien, Hefen, Phagen) die gewünschten herauszufinden. Man wird nämlich in der Regel einen oft nicht unerheblichen Anteil von Ausgangsklonen (wenn z.B. ein nur einfach geschnittener Vektor nicht vollständig dephosphoryliert bei der Ligation eingesetzt worden war) oder falschen Klonen (wenn z. B. bei einer "Shot gun"-Klonierung verschiedene Kombinationen von ligierten Fragmenten und Vektoren möglich waren) vorfinden, also einen Hintergrund an unerwünschten Klonen. Wieviele Klone man untersuchen muß, um eine reelle Chance zu haben, darunter einen richtigen zu finden, hängt von der Zahl der Gesamtklone und der der Hintergrundklone ab, die man gegebenenfalls durch Kontrollklonierungen (nur Ausgangsvektor allein z. B.) ermitteln kann. Bei manchen Klonierungen kann man durch die Wahl geeigneter Vektoren dieses "Screening" stark vereinfachen. So sitzt bei manchen Vektoren der Polylinker in einem zweiten Antibiotika-Resistenz-Gen (im Fall von pBR 322 das Tetracyclin-Resistenz-Gen Tc^R), das durch Insertion von Fremd-DNA zerstört wird. Man muß Klone, die über ihre Ampicillin-Resistenz selektiert wurden, nur auf Tetracyclin-haltige Platten überimpfen: Positive, rekombinante Klone können dort nicht wachsen.

Andere Vektoren (pUC-Vektoren, M13-Phagen) besitzen im Bereich des Polylinkers Teile des lacZ-Gens (regulatorische Sequenzen + kodierende Region für 174 Aminosäuren = alpha-Region der beta-Galactosidase), die eine entsprechende Deletion im Genom des Wirtsstamms komplementieren (*Langley et al.*, 1972), und davor das lac I-Gen für den Repressor, der die Regulation von lac Z bewirkt. Wenn man auf den Selektionsplatten den Induktor Isopropylthiogalactosid (IPTG) anbietet, der den Repressor inaktiviert, kann das vom lacZ-Gen kodierte Enzym beta-Galactosidase das ebenfalls angebotene Substratanalog 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid (X-Gal) in das entsprechende Indoxylderivat überführen, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert wird. Besitzen Bakterienkolonien das intakte lac Z-Gen, werden sie blau; ist in den Polylinker, der im lac Z-Gen sitzt, Fremd-DNA inseriert, so daß keine funktionelle beta-Galactosidase mehr gebildet werden kann, bleiben sie weiß.

Solche "Screening"-Methoden sind nicht mehr anwendbar, wenn durch einen vorausgegangenen Klonierungsschritt ohnehin schon Fremd-DNA im Polylinker sitzt. Weitere Techniken stehen dann zur Verfügung: So kann man entweder Kolonien direkt (Koloniehybridisierung zum Untersuchen vieler Klone auf einmal) oder nur ihre Plasmid-DNA, die durch Minipräparationen gewonnen wird, mit radioaktiv markierten, spezifischen Proben hybridisieren (Dot Blot oder Southern Blot), um den richtigen Klon

herauszufinden. Und schließlich genügt es in vielen Fällen, die DNA einiger Plasmid-Minipräparationen nur mit analytischen Restriktions-Spaltungen zu untersuchen (Restriktionsspaltmuster).

4.2.5.1. IPTG/X-Gal-System

Dieses Selektionssystem war nur anwendbar bei der Transformation geeigneter Wirtstämme (z.B. JM 109) mit Plasmiden, die das lac I-Gen und den Teil des lac Z-Gens, der für das alpha-Peptid der β -Galactosidase kodiert, besitzen, wovon letzterer nach Insertion von Fremd-DNA nicht mehr funktionell war (z. B. pUC-Plasmide und M13-Phagen-DNA). Bevor Transformationsansätze auf Selektionsmedien ausplattiert wurden, waren auf den Platten bereits 100 μ l einer 2 % X-Gal-Lösung in H_2O verteilt worden. Zu den Zellen gab man während der Erholungsphase 10 μ l IPTG, 100 mM, zur Induktion der beta-Galactosidase.

4.2.5.2. Koloniehybridisierung (nach Grunstein und Hogness, 1975)

Auf Bakterienkulturplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium wurden passende Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll) mit aufgedruckter Karoeinteilung gelegt; diese saugten sich mit Feuchtigkeit voll und blieben so gut an der Platte haften.. Pro Karo konnte ein Klon mit sterilem Zahnstocher von der Transformationsplatte überimpft und ausgestrichen werden und zwar immer hintereinander auf 2 Parallelfilter. Nach mindestens 5 h Inkubation bei 37°C waren die Kolonien soweit gewachsen, daß sie schon schwach sichtbar wurden, und die Filter konnten von jeweils einer der Parallelplatten abgezogen werden. Zum Denaturieren, Neutralisieren und Fixieren der DNA wurden die Filter nun dreimal hintereinander in verschiedenen Lösungen getränkt. Einmal 3 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH (Denaturierung) und zweimal 3 min in 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Neutralisierung). Danach wurden sie entweder 2 h im Vakuumschrank bei 80°C gebacken (Fixieren der DNA) oder 3 min mit einer UV-Lichtquelle (254 nm) bestrahlt ("UV-Crosslinking"). Danach waren sie fertig zum Hybridisieren.

4.2.5.3. Mini-Plasmid-Präparationen

Damit konnte schnell die DNA einer größeren Anzahl von Klonen erhalten werden. Es

wurden Minikulturen von Kolonien aufgearbeitet, die mindestens 6 h, besser aber über Nacht in 5 ml Selektionsmedium bei 37°C herangewachsen waren.

Alkali-Methode (nach Birnboim und Doly, 1979):

Lösung 1:	50 mM	Glucose
(eiskalt)	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl (pH 8,0)

Lösung 2:	0,2 N	NaOH
(frisch)	1 %	SDS

Der Niederschlag von 1,5 ml Zellsuspension wurde nach dem Abzentrifugieren (Eppendorf-Gefäße, 1,5 ml, in Eppendorf-Tischzentrifuge) in 100 µl Lösung 1 aufgenommen und 5 min bei RT belassen. Dann wurden 200 µl Lösung 2 dazu gegeben und nach gutem Durchmischen das Ganze 5 min auf Eis gestellt. Schließlich kamen noch 150 µl Natriumacetat, pH 4,8, dazu und nach weiterer Inkubation von 5 min auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und einmal mit "Chloropane" und ein weiteres Mal mit "Chloriso" extrahiert. Durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol bei RT wurde die DNA gefällt und konnte schon nach 2 min abzentrifugiert werden. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen wurde der Niederschlag in 50 µl TE aufgenommen und bei 4°C oder -20°C aufbewahrt. Die so gewonnene Plasmid-DNA konnte durch Restriktionsspaltungen mit anschließender Gelelektrophorese analysiert werden. Sie war auch geeignet, um bei Ligationen und weiteren Klonierungsschritten Einsatz zu finden.

"Boiling"-Methode (nach Maniatis et al., 1982, und Wilmzig, 1985):

Lysis-Puffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	62,5 mM	EDTA
	0,4 mM	Triton X-100
	2,5 M	Lithiumchlorid

Lysozym-Lösung (in H₂O): 10 mg/ml, frisch

Der Niederschlag einer 1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde in 250 µl Lysis-Puffer aufgenommen und mindestens 5 min auf Eis gestellt. Dann gab man 25 µl

Lysozym-Lösung dazu und mischte gut. Sofort danach wurde der Ansatz 1 min im Wasserbad gekocht und kam anschließend 5 min auf Eis. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei RT von ca. 15 min. Der resultierende, schleimige Niederschlag konnte mit einer Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Die DNA konnte nach Extraktion mit "Chloropane"/"Chloriso" unter Zugabe von 500 µl Ethanol gefällt werden. Das weitere Verfahren entsprach dem der Alkali-Methode. Ohne Phenol-Extraktion waren die Plasmid-Minipräparationen oft nicht durch Restriktionsenzyme spaltbar.

4.2.5.4. Dot Blot

Hier konnten Plasmid-Minipräparationen noch vor dem Extraktionsschritt und vor der Fällung direkt zur Hybridisierung auf Filterpapier (Genescreen) aufgebracht werden. Dazu benötigte man 2 Dot-Blot-Scheiben aus Plexiglas, die gleich groß sind und von denen eine viele kleine Bohrungen besitzt. Genescreen-Filterpapier wurde auf die Größe dieser Platten zugeschnitten, kurz in Wasser und 2xSSC getränkt und auf 3 gleich große Whatman-Papiere gelegt. Zusammen wurden sie zwischen die Dot-Blot-Scheiben gespannt und zwar so, daß sich die Bohrungen auf der Seite des Genescreen-Filters befanden. 10µl-Aliquots aus den Plasmid-Minipräparationen wurden auf 0,5 M NaOH gebracht, 10min gekocht und dann mit Mikropipetten vorsichtig durch die Bohrungen der oberen Dot-Blot-Platte auf den Genescreen-Filter aufgebracht. Anschließend wurde der Filter herausgenommen und die DNA durch Backen oder UV-Crosslinking fixiert (siehe Koloniehybridisierung).

4.2.5.5. Southern Blot

siehe 8) Blotting Methoden

4.2.5.6. Plaque-Hybridisierung

Diese Methode verfährt nach dem selben Prinzip wie die Koloniehybridisierung für Bakterien. Nur wurde hier ein Abklatsch von Plaques mit jeweils 2 Membranfiltern pro Platte (hintereinander für 1 bis 2 min) durchgeführt und dann weiter verfahren, wie oben beschrieben. Es konnten auch wie beim Dot-Blot-Verfahren direkt einige µl von Überständen einer abzentrifugierten, phagentransfizierten Bakteriensuspension auf den

Genescreen-Filter aufgebracht werden. Im Überstand befinden sich Phagen mit einzelsträngiger DNA.

4.2.5.7. Identifizierung von positiven Hefe-Transformanden

Hefen werden nur durch Analyse ihrer Gesamt-DNA auf positive Transformanden hin untersucht (DNA-Präparations-Methode siehe 4.2.6.3.). Diese wird mit geeigneten Enzymen gespalten und auf Anwesenheit des gewünschten DNA-Fragments aus dem transformierenden Plasmid mit Hilfe von Southern Blotting und Hybridisierung mit geeigneten radioaktiven Proben untersucht.

4.2.6. DNA-Isolierungsmethoden im präparativen Maßstab

Wenn man positive Klone gefunden hat, ist es sinnvoll, sich davon eine größere Menge DNA zu präparieren, die besonderen Reinigungsverfahren unterworfen wird. Diese ist dann gut lange Zeit aufzubewahren und für viele enzymatische Reaktionen wesentlich besser geeignet als DNA aus Minipräparationen.

4.2.6.1 Präparation von Plasmiden und doppelsträngiger M13-Phagen-DNA aus E.coli durch alkalische Lyse mit anschließender CsCl-Gradientenzentrifugation (nach Birnboim und Doly, 1979)

Lösung 1:	50	mM	Glucose
(eiskalt)	25	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA

Lösung 2:	0,2	N	NaOH
(frisch)	1	%	SDS

Es wurden 200 ml einer Bakterien-Hauptkultur aufgearbeitet. Der Niederschlag nach Abzentrifugieren der Zellen (Sorvall) und Dekantieren des Überstands wurde in 4 ml Lösung 1 resuspendiert, die 5 mg/ml Lysozym enthielt, und 5 min bei RT belassen. Dann wurde die Suspension in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (30 ml, Sorvall) überführt und

auf Eis gestellt. Es folgten Zugabe von 8 ml Lösung 2 (10 min auf Eis) und 6 ml 3 M Natriumacetat, pH 4,8 (10 min auf Eis). Danach wurde die Suspension 20 min bei 20.000upm scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Falcon-Röhrchen (50ml) mit "Chloropane" extrahiert und in einem Corex-Röhrchen mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Nach 15 min bei RT folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 10.000 upm. Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1,5 ml TE aufgenommen. Nach vorsichtigem Lösen der DNA gab man 1,8 mg CsCl und 180 µl einer 1 % Ethidiumbromid-Lösung dazu. Das Ganze wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (für Beckman-Rotor TLV 100, "Quick Seal") überführt bis fast unter den Rand, die dann zugeschweißt wurden. In der Mini-Ultrazentrifuge (TL 100) wurde die Zentrifugation zum Einstellen des CsCl-Gradienten durchgeführt (3 h, 100.000 upm, 20°C). Dieser Zentrifugationsschritt war auch in der großen Ultrazentrifuge möglich, im entsprechend größeren Volumen passend für die Zentrifugenröhrchen (4,2 ml), dann allerdings für 16 h bei 45.000 upm.

Nach der Zentrifugation konnte die Plasmid-Bande durch Beleuchten mit UV-Licht sichtbar gemacht werden - bei ausreichender Menge war sie auch schon bei Tageslicht zu sehen - und vorsichtig mit einer Spritze, deren Kanüle man durch die Röhrenwand stieß, abgezogen werden. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, mußte man es mit Isopropanol ausschütteln. Dazu überschichtete man die Lösung mit 1 Vol. Isopropanol, das mit TE gesättigt war, mischte gut und entfernte nach erfolgter Phasentrennung die obere davon, die Isopropanol mit Ethidiumbromid enthielt; dies wurde mehrmals wiederholt, bis die Plasmid-Lösung ganz entfärbt war. Sie wurde dann mit 3 Vol. Wasser verdünnt, um die CsCl-Konzentration herabzusetzen; daraus wurde die DNA direkt unter Zugabe von 2 Vol. EtOH bei RT gefällt. Nach Waschschrift und Trocknung wurde die DNA in 300 µl TE aufgenommen und die Konzentration durch Extinktionsmessung am Photometer bestimmt, wobei 1 OD_{260 nm} einer Konzentration von 50 µg/ml entsprechen.

4.2.6.2. Isolierung einzelsträngiger M13-Phagen-DNA (nach Heidecker *et al.*, 1980):

Einzelsträngige Phagen-DNA kann man aus dem Überstand einer M13-transfizierten Bakteriensuspension gewinnen.

Nach Abzentrifugieren von 200 ml einer Suspension von phagen-transfizierten Bakterien wurde der Überstand zur Fällung der Phagen auf 4 % PEG (Polyethylenglykol) und 0,5 M NaCl gebracht und 1 h stehen gelassen. Dann wurden die Phagen abzentrifugiert (15min, 8000 upm), in 70 ml TE mit 0,5 % Sarcosyl aufgenommen und mit PEG und NaCl wie zuvor repräzipitiert. Nach 15 min auf Eis wurden sie erneut abzentrifugiert und der Niederschlag in 6 ml TE aufgenommen. Die Lösung wurde auf 50 mM Natriumacetat, pH 5,0, 10 mM EDTA und 0,9 % SDS gebracht. Nach einer "Hot-Phenol"-Extraktion (siehe RNA-Isolierung aus Hefe), drei "Chloropane"- und einer "Chloriso"-Extraktion wurde die einzelsträngige DNA gefällt. Nach dem Aufnehmen in TE konnte die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden: 1 OD_{260 nm} entsprach 40 µg/ml einzelsträngiger DNA.

4.2.6.3. Isolierung von Hefe-DNA (nach *Sherman et al.*, 1983)

Die zu untersuchenden Hefe-Klone wurden in 40 ml Selektionsmedium Leu⁻ bis zur stationären Wachstumsphase (hier bei OD 1,0 erreicht) herangezogen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml 0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA, pH 7,5, resuspendiert, mit Zymolyase 100.000 versetzt (Endkonzentration 80 µg/ml) und 1 h bei 37°C inkubiert. Sie wurden dann 5 min bei 5000 upm abzentrifugiert und in 5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20mM EDTA resuspendiert; dann wurden sie mit 0,5 ml 10 % SDS versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 1,5 ml 5 M Kaliumacetat, worauf sie 1 h auf Eis blieben. Danach wurde abzentrifugiert (10 min, 10.000 upm) und der Überstand mit 2 Vol. Ethanol bei RT gefällt. Der Niederschlag nach der Zentrifugation (15min, 50.000 upm) wurde vorsichtig in 3 ml TE gelöst, was längere Zeit in Anspruch nehmen konnte. Die Lösung wurde nochmals 15 min bei 10.000 upm abzentrifugiert und der Überstand mit 50 µg/ml RNase A 30 min bei 37°C inkubiert. Jetzt wurde das Ganze vorsichtig mit 1 Vol. Isopropanol überschichtet. Durch langsames Schwenken kam es an der Phasengrenze zur allmählichen Durchmischung. In der Interphase bildete sich ein DNA-Kokon aus, der mit einer Pipettenspitze herausgezogen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden konnte. Nach Entfernen von Isopropanol und kurzer Lufttrocknung wurde das Präzipitat in 300 µl TE aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (1 OD_{260 nm} = 50 µg/ml DNA).

4.2.7. Isolierung von RNA aus Hefe

4.2.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA (nach Domdey et al., 1984)

Hefezellen wurden in 100 ml Selektionsmedium Leu^- bis zur stationären Wachstumsphase (ca. OD 1,0) herangezogen, abzentrifugiert und nochmals für ca. 4 bis 6 h in 100 ml Vollmedium YPD inkubiert (2 - 3 Generationszeiten). Dann wurden sie geerntet und in 10ml Natriumacetat-Puffer resuspendiert (Falcon, 50 ml):

Natrium-Acetat-Puffer:	50 mM	Natrium-Acetat
(pH 5,0)	10 mM	EDTA

Sofort nach Zugabe von 1 ml 10 % SDS wurden sie mit 1 Vol. heißem Phenol (65°C, äquilibriert mit Natriumacetat-Puffer, pH 5,0) versetzt und im Schüttelwasserbad bei 65°C für 4 min unter heftigem Schütteln extrahiert. Es folgte eine schnelle Abkühlung in CO_2 /Ethanol für ca. 1 min. Nach dem Abzentrifugieren wurde die untere Phase entfernt (Interphase noch belassen) und das Ganze noch einmal wiederholt. Diesmal wurde am Schluß die Oberphase in ein neues Gefäß überführt und noch einmal mit "Chloropane" (10min Schütteln bei RT) und abschließend mit "Chloriso" extrahiert. Danach konnte die RNA über Nacht bei -20°C mit 1/10 Vol. Natriumacetat, pH 5,0, und 3 Vol. Ethanol gefällt werden. Der Niederschlag wurde in H_2O aufgenommen und noch ein- bis zweimal umgefällt. Der "Chloriso"-Schritt und mehrmaliges Umfällen wurden notwendig, wenn die RNA später bei enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden sollte und nicht nur für einen Northern Blot benötigt wurde. Die Ausbeuten an Gesamt-RNA betrugen ca. 5 mg RNA pro 100 ml Ausgangskultur.

4.2.7.2. Isolierung von Poly (A)⁺-RNA

Um polyadenylierte RNA von der Gesamt-RNA zu isolieren, bediente man sich der Affinitäts-Chromatographie mit sog. Oligo-dT-Zellulose-Säulen (Aviv und Leder, 1972):

0,6 bis 0,8 ml Säulenmaterial wurden in einer Glassäule mit Filter (Biorad) nacheinander mit 10 ml 0,1 M NaOH und 20 ml H_2O gewaschen und mit 50 ml Hochsalz-Puffer äquilibriert.

Säulenmaterial: Oligo-dT-Cellulose type 3 von Collaborative Research Inc.

Hochsalz-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,2 %	SDS
	5 mM	EDTA, pH 7,5
	0,5 M	NaCl

Dann wurde die Gesamt-RNA (ca. 2 mg) in 2,5 ml Elutionspuffer aufgenommen und 3 min auf 65°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung durch Zugabe von 5M NaCl auf 0,5 M NaCl gebracht und auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluß (ca. 1 Tropfen pro 7 sek) wurde aufgefangen und noch einmal über die Säule gegeben. Nach dem 2. Durchlauf konnte er gefällt werden und ergab die Poly A⁻-Fraktion. Die Säule wurde dann mit 50 ml Hochsalzpuffer gewaschen. Nun wurde die polyadenylierte RNA mit 8 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen (ca. 1 Tropfen pro 5 sek).

Elutionspuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,2 %	SDS
	1 mM	EDTA, pH 7,5

Etwa 1 bis 2 % der Gesamt-RNA erhielt man als Poly A⁺-Fraktion, die nach zweimaligem Umfällen weiter verwendet werden konnte.

4.2.8. Transfer von DNA oder RNA aus Gelen auf Nitrozellulose-Filter

4.2.8.1. Southern Blot für DNA (*Southern*, 1975)

DNA-Proben werden so gespalten, daß charakteristische Spaltmuster der richtigen Klone erwartet werden. Dann werden sie auf normalen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und von dort, nach Denaturierung und Neutralisierung, auf Nitrozellulose-Filter transferiert.

Lösung 1 (Denaturierungslösung):	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Lösung 2 (Neutralisierungslösung):	1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 8,0
Transfer-Puffer:	20 x SSC

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit angelegtem Lineal unter dem UV-Licht photographiert, um die Lage der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden, v. a. auch die des DNA Längenmarkers aufzuzeigen. Dann wurde das Gel 1 h in Lösung 1 (Denaturierung der DNA) und anschließend 1 h in Lösung 2 (Neutralisierung) geschwenkt, woraufhin es vorbereitet war für den Transfer der DNA:

Auf eine Schaumstoffunterlage in einer Schale wurde überstehendes Whatman-Papier (1 bis 3 Schichten) so gelegt, daß die Enden in 20 x SSC-Puffer tauchten, der sich in der Schale in ausreichender Menge befand, aber nicht das Niveau der Schaumstoffoberseite erreichen durfte. Auf diese Unterlage, die nur durch die Kapillarkräfte des Papiers mit Puffer befeuchtet wurde, legte man das Gel mit der Unterseite nach oben. Zuvor hatte man einen Bogen Nitrozellulose-Filter (Genescreen) und drei Blätter Whatman-Papier auf Gelgröße zugeschnitten. Der Genescreen-Filter war mit H_2O befeuchtet und 10 min in 20 x SSC eingelegt worden, die Whatman-Papiere wurden nur kurz mit 20 x SSC benetzt. Erst Genescreen- und dann Whatman-Filter wurden gut anliegend auf die Gelunterseite - jetzt oben - gelegt und mit einem größeren Stapel Papierhandtüchern, die auf etwa Gelgröße zusammengelegt worden waren, bedeckt; das Ganze wurde von oben noch beschwert. Um das Gel herum legte man dicht anschließend vorher so Parafilm, daß die Filter und Handtücher nicht mit der nassen Whatman-Papierunterlage des Gels oder gar dem Puffer-Reservoir selbst in Berührung kamen. Diesen Aufbau ließ man über Nacht stehen. Durch Kapillarkräfte saugte die Papieraufgabe Puffer durch das Gel und den Genescreen-Filter hindurch nach oben und transferierte dabei die DNA aus dem Gel heraus auf den Nitrozellulose-Filter, durch den sie nicht hindurch konnte. Nach 16 bis 24 h Blot-Vorgang nahm man das Ganze auseinander, zog den Filter vom Gel ab und fixierte auf ihm die DNA durch Bestrahlen mit einer UV-Quelle (254 nm) für 3 min ("UV-crosslinking"); alternativ konnte man den Filter auch 2 h im Vakuumofen bei 80°C "backen". Nach Fixieren der DNA konnte der Nitrozellulose-Filter zum Hybridisieren eingesetzt werden.

4.2.8.2. Northern Blot (nach Thomas, 1980)

Hier wird RNA (und meist ein DNA-Längenmarker) aus einem denaturierenden Glyoxalgel heraus auf einen Nitrozellulose-Filter transferiert.

Dazu wurde das Glyoxalgel nach der Elektrophorese direkt, ohne Photographieren (DNA-Längenmarker wurde vorher radioaktiv markiert) und Denaturierungsschritt, verwendet. Der Transfer der DNA vom Gel auf den Genescreen-Filter in 20 x SSC entsprach ansonsten der Vorschrift für den Southern Blot.

4.2.9. Filter-Hybridisierungs-Methoden

Filter zur Koloniehybridisierung, Dot Blot-, Southern Blot- oder Northern Blot-Filter können alle nach dem selben Prinzip mit radioaktiv markierten Proben hybridisiert werden. Die beiden gängigen Methoden unterscheiden sich je nach verwendeter Hybridisierungsprobe: a) Methode für nick-translatierte Proben und b) für 5'-³²P-markierte Oligodeoxynukleotide.

4.2.9.1. Hybridisierung mit nick-translatierten Plasmiden oder DNA-Fragmenten (nach Maniatis *et al.*, 1982)

<u>Puffer:</u>	<u>Vorhybridisierungs-</u> <u>Lösung</u>	<u>Hybridisierungs-</u> <u>Lösung</u>
Formamid	50 %	50 %
SSC	5 x	5 x
SDS	0,2 %	0,2 %
Natriumphosphat pH 7,0	50 mM	50 mM
BSA (Albumin)	0,1 %	0,1 %
Ficoll	0,1 %	0,1 %
PVP (Polyvinyl- pyrrolidon)	0,1 %	0,1 %
Einzelstrang-DNA	200 µg/ml	100 µg/mg
EDTA	-	10 mM
Dextransulfat	-	10 %
³² P-NTP-nick- translatierte Probe	-	5-10x10 ⁶ cpm (=ca. 50-100 fMol eines 900 bp Fragments)/5 ml

Die Filter wurden bei 50°C 2 h in einer Schale mit 50 ml Vorhybridisier-Lösung vorhybridisiert und dann 6 bis 16 h bei 37°C im 50 ml-Falcon- Röhrchen mit 5 ml Hybridisier-Lösung unter langsamem Drehen hybridisiert. Anschließend wurden sie

herausgenommen und nach folgendem Schema gewaschen:

10 min	in 2 x SSC, 0,2 % SDS	bei RT
10 min	in 2 x SSC, 0,2 % SDS	bei 65°C
10 min	in 0,2 x SSC, 0,2 % SDS	bei RT
10 min	in 0,2 x SSC, 0,2 % SDS	bei 65°C

Danach konnten sie in Haushaltsfolie eingepackt, und der Film zur Autoradiographie aufgelegt werden.

4.2.9.2. Hybridisierung mit endmarkierten Oligodeoxyribonukleotiden (nach Newman *et al.*, 1983)

<u>Puffer:</u>	<u>Vorhybridisierungs- Lösung:</u>	<u>Hybridisierungs- Lösung:</u>
SSC	6 x	6 x
SDS	0,2 %	0,2 %
BSA	0,2 %	0,1 %
Ficoll	0,2 %	0,1 %
PVP	0,2 %	0,1 %
5'- ³² P-markiertes Oligodeoxynukleotid	-	2 - 10 x 10 ⁶ cpm (=ca. 1,5 - 8 pmol) pro 5 ml

Nach der Vorhybridisierung in 50 ml der entsprechenden Lösung für 1 bis 2 h bei 65°C folgte die Hybridisierung für 4 bis 6 h in 5ml der Hybridisierungs-Lösung bei 30°C und zwar im 50 ml-Falcon-Röhrchen unter Drehen. Auch hier wurde anschließend bei 2 verschiedenen Temperaturen gewaschen, wobei sich die höhere Temperatur T_x nach der Länge und der Basenzusammensetzung des Oligodeoxynukleotids richtete:

Nach einer Faustregel kann man den Schmelzpunkt (T_m) von DNA/DNA- oder RNA/DNA-Hybriden so berechnen: Jedes A-T- oder A-U-Basenpaar wird mit 2°C, jedes G-C-Paar mit 4°C angerechnet. Ein Oligodeoxynukleotid von z. B. 20 Nukleotiden Länge (20 mer) mit einem G-C-Gehalt von 50 % ergäbe einen Schmelzpunkt T_m von $10 \times 2^\circ\text{C} + 10 \times 4^\circ\text{C} = 60^\circ\text{C}$. Die optimale Waschttemperatur, um möglichst viel unspezifisch

gebundenes Oligo vom Filter abzuwaschen, aber spezifische Hybride zu erhalten, liegt einige $^{\circ}\text{C}$ unter dem Schmelzpunkt. Hier wurde meist verwendet $T_x = T_m - \text{ca. } 5^{\circ}\text{C}$.

Gewaschen wurde in der Reihenfolge:

2 x	10 min	in 6 x SSC, 0,2 % SDS	bei 30°C
1 x	10 min	in 6 x SSC, 0,2 % SDS	bei T_x .

Danach wurde der Filter in Folie verpackt und exponiert.

4.2.10. DNA-Sequenzierung

Sequenzierung von DNA wurde nach dem Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Verwendung von 2'-3'-Dideoxynukleotid-Analoga (ddNTPs) der normalen 2'-Deoxyribonukleotide (dNTPs) und ihrem zufälligen Einbau in einen entstehenden DNA-Strang. Da sie keine 3'-OH-Gruppen für die nächste Phosphodiesterbindung besitzen, bricht an dieser Stelle die Kette ab. Mit dieser Methode können sowohl M13-Einzelstränge als auch doppelsträngige Plasmide sequenziert werden.: Eine komplementäre Kopie einer DNA-Sequenz wird vom Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, beginnend von einem Oligodeoxynukleotid-Primer, der an die DNA hybridisiert, synthetisiert. Die Verlängerung des Stranges erfolgt in der 5'-3'-Richtung. Die Reaktion wird in 4 Ansätzen durchgeführt, wovon jeder vier dNTPs (darunter ein radioaktiv markiertes Nukleosid-alpha- ^{35}S -Thiotriphosphat) und eines der 4 ddNTPs enthält. Jeder Ansatz resultiert in einem Gemisch von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, die alle ein gemeinsames 5'-Ende tragen (=Primer) und alle mit demselben ddNTP enden, allerdings an verschiedenen Stellen, abhängig von der Sequenz des Matrizen-Strangs. Diese Fragmente können gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Trägt man die 4 Ansätze nebeneinander auf, kann man direkt anhand der verschiedenen "Strickleiter"-Muster die Sequenz ablesen.

Denaturierungs-Puffer:	0,2	M	NaOH
	0,2	mM	EDTA, pH 8,0
Hybridisier-Puffer:	7	mM	MgCl_2
	30	mM	NaCl
	10	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA, pH 8,0

Radioaktivität: ^{35}S -dATP (600 Ci/mmol, 8 uCi/ μl)

Primer:

Vorwärtsprimer für M13/pUC: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Rückwärtsprimer für M13/pUC: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

Diese Primer können für alle pUC-Plasmide und doppelsträngige M13-Phagen-DNA zum Sequenzieren verwendet werden und hybridisieren vor, bzw. hinter dem Polylinker.

Nukleotid-Gemische:

	<u>G-Mix</u>	<u>A-Mix</u>	<u>T-Mix</u>	<u>C-Mix</u>
alpha- ^{35}S -dATP	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
dGTP	5 μM	100 μM	100 μM	100 μM
dTTP	100 μM	100 μM	5 μM	100 μM
dCTP	100 μM	100 μM	100 μM	10 μM
ddGTP	120 μM	-	-	-
ddATP	-	100 μM	-	-
ddTTP	-	-	-	500 μM
ddCTP	-	-	-	100 μM

alle in Hybridisier-Puffer

Auffüll-Lösung: alle 4 dNTPs je 125 μM

Sequenzier-Reaktion:

Denaturieren der DNA: Dies war nur nötig bei doppelsträngiger Plasmid-DNA, nicht bei einzelsträngiger M13-Phagen-DNA. Dabei wurden 2 μg Plasmid-DNA in 40 μl Denaturierungspuffer 5 min bei RT inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Ammoniumacetat, pH 4,5, und 2 Vol. Ethanol gefällt (5 min bei -70°C). Abzentrifugieren, Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen der DNA folgten.

Anhybridisieren des Primers: Um den gewünschten Primer an die denaturierte DNA anhybridisieren zu können, wurde diese zunächst in 15 μl Hybridisier-Puffer aufgenommen, worin auch der Oligodeoxynukleotid-Primer in einem ca. 5- bis 10-fachen molaren Überschuß zur Plasmidvorlage und 16 μCi alpha- ^{35}S -dATP enthalten waren. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert.

3) Sequenzier-Reaktion: Während des Hybridisier-Vorgangs wurden je 2 µl der 4 verschiedenen Nukleotid-Gemische in 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt (bezeichnet mit A, C, G und T, je nach enthaltenem ddNTP). Nach erfolgter Hybridisierung des Primers an den zu sequenzierenden DNA-Strang wurden zum Hybridisier-Gemisch 2 Units Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I gegeben und gut gemischt. Von diesem Ansatz wurden je 3 µl mit den 4 vorgelegten dNTP/ddNTP-Aliquots (2 µl) vereinigt; es folgte eine Inkubation von 20 min bei 37°C, nach der zu jedem der 4 Reaktionsgefäße 1,5 µl Auffüll-Lösung zupipettiert wurden und die Reaktion noch für 15 min fortgesetzt wurde. Zum Schluß trocknete man die Ansätze ein und nahm sie in 4 µl Formamid-Auftragspuffer wieder auf. In dieser Form konnten sie entweder für einige Zeit unbeschadet aufbewahrt oder sogleich der gelelektrophoretischen Auftrennung unterworfen werden.

Vorbereiten der Sequenzgele: Bevor denaturierende Polyacrylamid-Gele gegossen werden konnten, mußten die Platten vorbereitet werden. Da Strahlung, die von ^{35}S -Quellen ausgeht, nur sehr kurze Distanzen überbrücken kann, müssen erstens Sequenzgele sehr dünn sein, und zweitens darf bei der Autoradiographie nach erfolgter Elektrophorese der Film nicht durch eine Haushaltsfolie vom Gel getrennt sein. Deshalb sorgt man durch Vorbehandeln der Platten dafür, daß das Gel nach der Elektrophorese an einer Platte fest kleben bleibt (Bindesilanisierung) und sich leicht von der anderen ablöst (Silikonisieren). Es kann dann nach Entfernen des Harnstoffs getrocknet werden, wodurch es noch dünner wird und der Film später nicht anklebt.

Bindesilanisieren von Glasplatten: Im Abzug wurde eine saubere Glasplatte mit 5 ml Bindsilanlösung (0,3 % Binde-Silan = gamma-Methacryl-oxypropyl-trimethylsilan und 0,3 % Essigsäure in Ethanol) auf einer Seite eingerieben und nach 5 min mit einem weichen Tuch nachpoliert. Dies wurde mit 5 ml Ethanol wiederholt.

Silikonisieren von Glasplatten: Eine Seite einer sauberen Glasplatte wurde im Abzug mit 5 ml Silikonisier-Lösung (5 % Dimethyldichlorsilan in Chloroform) eingerieben und nach 5 min nachpoliert. Das wurde mit 5 ml Ethanol wiederholt.

Gießen der Gele: Die Platten (40 x 20 cm²) wurden unter Verwendung von dünnen Abstandshaltern (0,3 mm) zusammengeklammert. Es wurden 6 % Polyacrylamid-Gele mit 7 M Harnstoff in 1 x TBE-Puffer gegossen.

Elektrophorese: Die Proben wurden 2 min gekocht und Aliquots von ihnen (1/3, 1/2) auf die Gele, die zuvor 1 h vorgelaufen waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2500 Volt (=ca. 25 mA) durchgeführt. Nach einer gewissen Zeit konnten noch einmal Aliquots der Proben in neuen Spuren aufgetragen werden, so daß später längere Sequenzen gelesen werden konnten.

Nachbehandeln der Gele: Nach der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten auseinandergenommen und die, an der das Gel klebte, für ca. 15 min in 10 % Essigsäure gelegt, um den Harnstoff aus dem Gel zu entfernen; Harnstoffreste hätten zum Ankleben der Filme geführt. Dann wurde das Gel unter heißem Luftstrom (Haar-Fön) getrocknet, woraufhin der Röntgenfilm für die Autoradiographie aufgelegt werden konnte. Der Film wurde in der Regel über Nacht exponiert.

4.2.11. Gerichtete M13-Einzelstrang-Mutagenese (nach Newman *et al.*, 1983)

Mit dieser Methode können gezielt Mutationen in einen bestimmten DNA-Bereich eingebracht werden (Punktmutationen, Deletionen, Insertionen). Zunächst benötigt man einen DNA-Einzelstrang (aus M13) und ein Oligodeoxyribonukleotid, komplementär zum zu verändernden DNA-Bereich; das Oligodeoxynukleotid kann nun in bestimmten Nukleotiden von der Gegenstrang-Sequenz abweichen (ergibt Punktmutationen) oder zu den beiden flankierenden Bereichen einer gewünschten Deletion komplementär sein oder den Bereich links und rechts von einer Insertions-Stelle umfassen, sowie die gewünschten einzuführenden Sequenzen, alles natürlich immer komplementär zum vorliegenden Einzelstrang. Bei der Mutagenese geht man nun so vor, daß man zunächst dem Oligodeoxynukleotid ermöglicht, an die DNA zu hybridisieren, wobei dort, wo mutiert werden soll, keine perfekte Basenpaarung möglich ist. Anschließend werden in ausreichender Menge die 4 dNTPs und das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zugegeben, welches vom Oligodeoxynukleotid ausgehend den komplementären Strang zur Vorlage synthetisiert. Am Schluß sorgt Ligase für den notwendigen kovalenten Ringschluß. Es liegen nun also zwei in weiten Bereichen basengepaarte DNA-Stränge vor; einer entspricht der Vorlage, der andere der mutierten Version. Mit diesen kann ein geeigneter *E. coli* Stamm transfiziert werden. Die gewünschten Klone, die die Mutation tragen, können durch Plaque-Hybridisierung mit dem Mutations-Oligodeoxynukleotid identifiziert werden.

Hybridisier-Puffer:	125 mM	Hepes, pH 7,5
	8 mM	MgCl ₂
	60 mM	NaCl
	1 mM	2-Mercaptoethanol

Nukleotid-Lösung: je 2,5 mM der 4 dNTPs in 10 mM DTT

0,5 pMol einer einzelsträngigen M13-Phagen-DNA wurden mit 20 pMol mutagenem Oligodeoxynukleotid (5'-³²P-markiert, 1 bis 5 Mio. cpm) in 12 µl Hybridisier-Puffer auf 80°C erhitzt und langsam auf 25°C abgekühlt. Dazu wurden 3 µl der Nukleotid-Lösung und 4 Units Klenow-Fragment gegeben. Die Auffüll-Reaktion wurde bei 15°C für 4 h durchgeführt. Anschließend kamen 1 µl 20 mM ATP und 10 Units T4-DNA-Ligase zum Ansatz, woraufhin die Inkubation für weitere 12 h bei 15°C fortgesetzt wurde. Man beendete die Reaktion, indem man sie auf 50 mM EDTA brachte und 10 min auf 70°C erhitze. Ein Aliquot von 4 µl wurde dann auf ein 1 % Agarose-Gel geladen, um die Umwandlung vom Einzelstrang in die Plasmidform zu kontrollieren. Mit 2 µl des restlichen Ansatzes konnten dann E.coli Bakterien vom Stamm JM 109, wie zuvor beschrieben, transformiert werden. Die Suche nach Mutanten erfolgte durch Hybridisierung der Plaques mit dem radioaktiv markierten, mutagenen Oligodeoxynukleotid.

4.2.12. *In vitro*-Transkription mit dem SP6-Transkriptionssystem

Für die *In vitro*-Transkription eines gewünschten Gens werden heute gerne Systeme verwendet, die von Bakteriophagen stammen (Chamberlin und Ryan, 1982). Als erstes Beispiel dieser Art wurde die RNA-Polymerase, die vom T7-Phagen von E.coli codiert wird und sehr spezifisch für T7-DNA ist, isoliert und charakterisiert. Vergleichbare Enzyme werden nach der Infektion durch eine Reihe anderer, sog. T7-ähnlicher Bakteriophagen (T3, SP6) induziert. Sie bestehen alle aus einer einzigen Polypeptid-Kette und erkennen als Promotoren nur ganz bestimmte Sequenzen im Genom des Phagen. Ein System dieser Art gibt es auch vom Phagen SP6, der *Salmonella typhimurium* infiziert und eine T7-artige RNA-Polymerase, die SP6-Polymerase, besitzt (Melton *et al.*, 1984). Dieses Enzym zeichnet sich durch eine größere Stabilität als die anderen dieser Gruppe aus und ist heute bei einer Reihe von Firmen käuflich erhältlich, ebenso wie die dazugehörigen Transkriptionsvektoren mit dem SP6-Promotor; die gängigsten davon sind die SP 64- und SP 65-Vektoren, die sich nur in der Orientierung des Polylinkers für die Klonierung unterscheiden. Das Enzym bindet nur an SP6-Phagen-Promotoren und transkribiert alle DNA-Sequenzen, die man anschließend daran in den Vektor hineinkloniert. Da es keine eindeutigen und effizienten Terminationssignale für die SP6-Polymerase gibt, muß man den Vektor im Anschluß an das eingefügte, zu transkribierende Gen mit einer geeigneten

Restriktions-Endonuklease aufschneiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur *in vitro* Transkription die SP6-Polymerase (Amersham) und der SP64-Vektor (Melton *et al.*, 1984) verwendet, in dessen Polylinker die zu transkribierenden Sequenzen eingefügt worden waren (z.B. pSPact64). In einigen Fällen wurde als Vorlage zur Transkription auch M13-DNA eingesetzt, in die zuvor Teile aus dem pSPact64-Konstrukt inklusive des SP6-Promotors kloniert worden waren.

4.2.12.1. Standard-Vorschrift

Die Standard-Reaktion der *In vitro*-Transkription wurde in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt und 1 h bei 40°C inkubiert. Sie hatte folgende Zusammensetzung:

50	μ g/ml	DNA-Vorlage (Template)
40	mM	Tris-HCl, pH 7,5
2	mM	Spermidin
6	mM	MgCl ₂
10	mM	DTT
500	μ M	ATP
500	μ M	CTP
500	μ M	GTP
500	μ M	UTP
2	mM	"cap"-Analog (m7GpppG)
2000	U/ml	RNasin
100	μ g/ml	BSA
700	U/ml	SP6-Polymerase

Die SP6-Polymerase begann unter diesen Bedingungen den größten Teil ihrer Transkripte mit "cap" am 5'-Ende (Konarska *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1983), da sie eine auffallende Präferenz für m7GpppG als Start-Dinukleotid hat. Ließ man "cap" weg, startete das Transkript mit einer Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende, nämlich ppp-5'G3'. Behandelte man es dann mit TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase), die Pyrophosphatgruppen abspaltet, so blieb nur noch eine Phosphatgruppe davon übrig. Sollte das Transkript gar nur mit einer OH-Gruppe beginnen, so behandelte man ein PPP-5'G3'-Transkript mit CIP (Calf Intestine

Phosphatase). Eine Alternativ-Methode sah ein "Priming" der Transkription mit einem Dinukleotid (NpN) vor, das den beiden ersten Nukleotiden des Transkripts entsprach. Ein dritter Weg ist die Hybridisierung des Transkripts mit einem Oligodeoxynukleotid und anschließender Verdau mit RNase H, die RNA in RNA/DNA-Hybriden spaltet und ebenfalls am 5'-Ende der RNA eine OH-Gruppe übrig läßt.

In obiger Vorschrift wurde ein sog. "kaltes" Transkript synthetisiert, das nicht radioaktiv markiert war. Wurde radioaktiv markierte RNA als Produkt gewünscht, so setzte man die Konzentration von UTP auf 250 μM herab und gab zum Reaktionsansatz noch 20 μCi alpha- ^{32}P -UTP 20mCi/ml, 800 Ci/mmol) zu (resultierende Endkonzentration: 1 mCi/ml).

Rechnung: Konzentration von radiomarkiertem UTP:

$$800 \text{ Ci/mMol} = 800 \text{ nCi/pMol} = 20 \mu\text{Ci}/25 \text{ pMol}$$

$$25 \text{ pMol}/20 \mu\text{l} = 1,25 \text{ nMol/ml} = 1,25 \mu\text{Mol/l} = 1,25 \mu\text{M}$$

Konzentration von "kaltem" UTP im "heißen" Spleißansatz: 250 μM

Verhältnis von "heißem" zu "kaltem" UTP:

$$1,25 \mu\text{M} : 250 \mu\text{M} = 1 : 200$$

Die molare Konzentration von radioaktivem UTP fiel also gegenüber der des nicht markierten UTPs nicht ins Gewicht. Aus dem prozentualen Einbau von Radioaktivität in das gebildete Transkript konnte auf dessen Syntheserate geschlossen werden.

Rechenbeispiel: Wenn von der oben eingesetzten Menge an cpm (Cerenkov counts) 10 % im Transkript wiederzufinden sind, heißt das, daß von dem in der Reaktion vorhandenen UTP (250 $\mu\text{Mol/l}$, das sind 5 nMol/20 μl) ebenfalls nur 10 %, das sind in diesem Fall 0,5 nMol oder 500 pMol eingebaut wurden. Bei einem Transkript von ca. 500 Nukleotiden Länge mit einer UTP-Gehalt von 1/4 werden für 1 pMol Transkript 125 pMol UTP benötigt. Der Einbau von 500 pMol UTP ergibt also die Synthese von 4 pMol Transkript.

Nach Beendigung der Transkription wurde der 20 μl Ansatz mit 10 μl Formamid-Auftragspuffer vermischt und 1 min bei 100°C denaturiert. Dann wurde er direkt auf einen denaturierenden, 5 %iges Polyacrylamid-Sequenzgel (20 cm x 20 cm x 0,3 mm) aufgetragen, das man 1 Stunde bei 25 mA und 700 V laufen ließ. Nach der Elektrophorese wurde auf das Gel 1 bis 10 min lang ein Röntgenfilm aufgelegt, wenn die Transkription unter Verwendung von alpha- ^{32}P -UTP durchgeführt worden war. Sollte nach 10 min Autoradiographie noch keine Bande zu erkennen sein, war die Reaktion so schlecht verlaufen, daß man auf eine weitere Verwendung des Transkripts besser verzichtete. Führt

man die Transkription unter "kalten" Bedingungen durch, konnte man die Banden im Gel durch "UV-Shadowing" sichtbar machen. Wenn eine Bande zu sehen war, war dessen Menge ohnehin ausreichend, um es weiter zu verwenden. In beiden Fällen mußte die gewünschte RNA-Bande aus dem Gel sorgfältig mit einer Skalpell-Klinge ausgeschnitten werden. Sie wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das bereits 400 µl eines Elutionspuffers, sowie 5 µg tRNA aus *E. coli* enthielt.

Elutionspuffer:	0,5 M	Ammoniumacetat
	0,1 %	SDS
	0,1 mM	EDTA
	10 mM	MgCl ₂

Dieser Elutionsansatz wurde daraufhin 1 h bei RT geschüttelt, um die RNA aus dem Gel zu eluieren. Danach wurde das Eluat vorsichtig, um kein Gelstückchen mitzunehmen, in ein weiteres Reaktionsgefäß transferiert und durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol gefällt. "Kaltes" Transkript wurde in 20 µl H₂O aufgenommen. Von einem "heißen" Transkript wurde erst im Szintillationszähler die Radioaktivität (Cerenkov) bestimmt, dann wurde es entsprechend der eingebauten Radioaktivitätsmenge in H₂O gelöst, so daß die Konzentration 10.000 bis 20.000 cpm/µl betrug. Dies gilt für den Fall, daß das Transkript gleich für Spleißversuche verwendet wurde. Sollte es vorher noch modifiziert werden (TAP-, CIP-, RNase H-Verdau), nahm man es komplett in 20 µl H₂O auf und setzte je 1/10 davon für die verschiedenen Ansätze ein.

4.2.12.2. Dinukleotid-Priming (*Konarska et al.*, 1983)

Hier wurde je nach gewünschtem Transkript ein Dinukleotid gewählt, daß den beiden Startnukleotiden am 5'-Ende entsprach. Startete das Transkript z. B. mit 5'-GANNN--, so verwendete man also HO-5'-GpA-3'-OH, kurz GpA als Primer. Man ließ zunächst beim Zusammenpipettieren der Polymerisations-Reaktion die beiden Nukleotide, die im Dinukleotid-Primer zu finden waren, in obigem Beispiel also GTP und ATP, weg und inkubierte die Reaktion ganz normal mit Enzym für 10 Minuten bei 40°C. Dann erst kamen die fehlenden beiden Nukleotide dazu (bei GpG als Primer fehlte natürlich nur eines). "Cap" ließ man überhaupt weg. Ab dann wurde so weiterverfahren wie bei der normalen Standardreaktion.

4.2.12.3. Modifikationen am fertigen Transkript

Nach Transkription (ohne "cap", mit alpha ^{32}P -UTP), Elektrophorese, Elution und Fällung konnte das Transkript auf verschiedene Weisen noch für diverse Zwecke modifiziert werden.

TAP (=Tobacco Acid Pyrophosphatase)-Behandlung:

TAP-Puffer:	60 mM	Natriumacetat
	10 mM	2-Mercaptoethanol
	1 mM	EDTA

Ca. 1 Mio. cpm Transkript wurden in einer 15 μl Reaktion in obigem Puffer und unter Zugabe von 40 U RNasin, 1 μg tRNA (zum Absättigen unspezifischer Reaktionen) und 2 U TAP 45 min bei 37°C inkubiert. TAP entfernt zwei Phosphatgruppen vom 5'-Ende der RNA; das resultierende Transkript hat nur noch eine Phosphatgruppe am Anfang.

CIP (Calf Intestine Phosphatase)-Behandlung:

Ca. 1 Mio. cpm Transkript wurden in einer 15 μl Reaktion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 mit 1 μg tRNA (Absättigen unspezifischer Reaktionen) und 0,1 U CIP 10 min bei 37°C inkubiert. CIP entfernt alle Phosphatgruppen vom Anfang der RNA, so daß an ihrem 5'-Ende nur eine OH-Gruppe hängt.

RNase H-Behandlung:

RNase H-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	130 mM	NH_4Cl
	10 mM	MgCl_2
	5 %	Saccharose

Das Prinzip beruht darauf, daß RNase H RNA in doppelsträngigen RNA/DNA-Hybridbereichen hydrolysiert. Dazu wurden Oligodeoxynukleotide verwendet, die zu einem bestimmten Sequenz-Abschnitt des Transkripts komplementär waren.

1 bis 2 Mio. cpm Transkript und 1 μg Oligodeoxynukleotid wurden in einem 15 μl Ansatz, noch ohne Enzym, in obigem Puffer zusammengemischt, 3 min auf 65°C (zum Denaturieren) gebracht und dann 15 min bei Raumtemperatur zum langsamen Abkühlen

stehen gelassen. Dabei hatte das Oligodeoxynukleotid Gelegenheit, an den entsprechenden Abschnitt der RNA zu hybridisieren. Erst dann wurden 0,5 U RNase H zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Der resultierenden RNA fehlt der Abschnitt, an den das Oligodeoxynukleotid hybridisiert hat; befindet sich dieser in der Mitte des Moleküls, so entstehen zwei verkürzte RNAs. RNase H-Verdau führt nach der Hydrolyse zu 3'-Phosphat- und 5'-OH-Enden in der RNA.

In allen drei Fällen verfuhr man in der Folge wie bei der Transkriptionsreaktion selbst. Man gab je 10 µl Formamid-Auftragspuffer zu den Reaktionsansätzen, kochte sie und führte eine denaturierende Gelelektrophorese (Polyacrylamidgel) durch, um das Produkt anschließend durch eine Radiogramm im Gel zu lokalisieren, auszuschneiden und zu eluieren. Fällung und Aufnehmen der RNA erfolgten wie zuvor beschrieben.

4.2.13. Hefe-Spleiß-Extrakt

Vorschrift: nach *Lin et al.*, 1985

Verwendeter Stamm : EJ 101 (alpha, trp 1, pro 1-126, prb 1-112, pep 4-3, prc 1-126)

Sorbitol-Puffer:

Puffer S-1: 1 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 30 mM DTT

Puffer S-2: " " " 3 mM DTT

Hypotonischer Puffer:

Puffer A: 10 mM Hepes-K⁺ (pH 7.0), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT

Dialyse -Puffer:

Puffer D: 20 mM Hepes-K⁺ (pH 7.0), 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50 mM KCl
20 % (v/v) Glycerin

Vorschrift:

Ein Liter Hauptkultur des Hefestamms EJ 101 in YPD wurde unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD von 2 (entspricht 1×10^7 Zellen/ml) herangezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 3000 upm für 5 min in einem Sorvall-GS3-Rotor geerntet. Nach Resuspendieren in 15 ml Puffer S-1 wurden sie für 15 min bei RT ohne Schütteln inkubiert, dann wie oben abzentrifugiert. Es folgten erneute Resuspension in 15 ml Puffer S-2, wobei 108 µl Zymolyase 100.000 (100.000 U/g, 10 mg/ml) zugegeben wurden. Die Zellen wurden bei 30°C 1 h leicht geschüttelt, um Sphäroblasten zu erhalten, was durch Zugabe von 30 µl Zellsuspension zu 3 ml 10% SDS und darauffolgende photometrische Extinktions-Bestimmung mehrmals während der Prozedur kontrolliert wurde. Dabei nahm die OD bei 800 nm auf ca. 10 bis 30 % des Ausgangswerts ab. Sodann wurden die Zellen abzentrifugiert, wie zuvor, und noch einmal schonend in 15 ml Puffer S-2 zum Waschen (Entfernen restlicher Zymolyase) aufgenommen und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Für die folgenden Schritte war es erforderlich, die Präparation im Eisbad, bzw. bei 4°C, fortzusetzen. Die Sphäroblasten sollten nun lysiert werden und wurden deshalb in 8 ml des hypotonischen Puffers A aufgenommen und in einem Glashomogenisator ("Douncer") mit besonders fest sitzendem Stopfen durch 5 kräftige Stöße geschert. Der feste Sitz des Glasstopfens scheint für die Gewinnung eines spleiß-aktiven Extrakts wichtig zu sein. Es folgte ein hypertonscher Schock zum Aufschließen der Kerne, was durch Zugabe von 2 M KCl bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M KCl erreicht wurde. Das Lysat wurde vorsichtig 30 min geschwenkt, dann 30 min bei 17.000 upm (Sorvall SS34-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann einer S-100 Zentrifugation für 30 min bei 44.000 upm (Beckman- Ultrazentrifuge, Ti60-Rotor) unterworfen, deren Überstand dann 3 h gegen Puffer D dialysiert und anschließend aliquotiert und bei -70°C eingefroren wurde. Dieser Hefe-Gesamtzell-Extrakt wurde für *In vitro*-Spleißreaktionen verwendet und konnte dazu auch mehrmals auf Eis aufgetaut werden. Der Proteingehalt wurde nach folgender Formel berechnet: $1,45 \times OD_{280nm} - 0,75 \times OD_{260nm} = \text{Protein (mg/ml)}$. Er betrug ca. 16 mg/ml.

4.2.14. *In vitro*-Hefe-Spleiß-Reaktion

Vorschrift nach Lin *et al.* (1985):

Standard-Spleiß-Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielten 4 µl Hefe-Gesamtextrakt (S-100), 4 µl Hefe-Spleiß-Puffer und 10.000 bis 30.000 cpm eines alpha-³²P-UTP markierten mRNA-Vorläufers (= ca. 0,4 bis 1,2 fMol) und wurden 30min bei RT inkubiert.

Hefe-Spleiß-Puffer: jeweils gleiche Teile von

20 mM	ATP
50 mM	MgCl ₂
600 mM	Kaliumphosphat, pH 7.0
30 %	PEG

Die resultierende Zusammensetzung war demnach:

2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 60 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0, 3 % PEG, 6 mM HEPES-K⁺ (pH 7.0), 0,06 mM EDTA, 0,15 mM DTT, 15 mM KCl, 6% Glycerin, sowie ca. 10 bis 12 mg/ml Hefe-Proteine und 0,04 bis 0,12 nM exogene RNA. Um die optimalen Spleiß-Bedingungen herauszufinden, wurde die Zusammensetzung der Spleiß-Reaktionen in einigen Experimenten variiert, ebenso wie verschiedene Reaktionszeiten getestet wurden (siehe Ergebnisse). Für verschiedene Experimente wurde auch kalte RNA (ca. 1/20 eines Transkriptionsansatzes) als Substrat eingesetzt. Zur Untersuchung ihrer RNA-Komponenten (siehe Spleiß-Nachweismethoden) wurden die Spleiß-Reaktionen anschließend durch Zugabe von 290 µl Terminationslösung gestoppt, zweimal mit "Chloropane" extrahiert und gefällt.

Spleiß-Terminationslösung:

0,25 %	SDS
6 mM	EDTA
200 mM	Natriumacetat, pH 5.0
100 mM	NaCl
5 µg/ml	t-RNA (aus E.coli)

Zur Untersuchung der Spleiß-Komplexe aus Protein und RNA fanden andere Methoden Anwendung, nämlich Glycerin-Gradienten und native Gele (siehe entsprechende Kapitel).

4.2.15. Nachweis von Spleißreaktions-Intermediaten und -Produkten

4.2.15.1. Denaturierende Gel-Elektrophorese

(bei Verwendung eines alpha-³²P-Transkripts als mRNA-Vorläufer-Molekül)

Der Niederschlag aus der "Chloropane"-extrahierten und gefällten Spleiß-Reaktion wurde in 20 µl Formamid-Auftrags-Puffer aufgenommen, 1 min bei 100°C denaturiert und dann auf ein denaturierendes 8 %-Polyacrylamid-Gel (20 x 40 cm², Dicke 1,5 mm) geladen, das bereits ca. 30 min bei 25 mA und ca. 500 V vorgelaufen war. Die Elektrophorese lief bei

gleicher Stromstärke für 12 h, wonach der Xylencyanol-Farbmarker am Schluß jedes Mal im unteren Drittel des Gels angelangt war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel durch Auflegen eines Röntgenfilms über Nacht exponiert (bei -70°C). Bei Entwicklung am nächsten Tag waren in der Regel die Banden, die mit den Zwischenprodukten (2/3-Molekül und Exon 1) und Endprodukten der Spleißreaktion (reife mRNA und herausgeschnittenes Intron) korrespondierten, gut auf dem Film erkennbar. Die Konzentration des Gels von 8 % war notwendig, um die verzweigten Lasso-Strukturen (2/3-M., Intron) von den linearen Formen der RNA zu unterscheiden.

4.2.15.2. Reverse Transkription = "Primer Extension"

(bei Verwendung von nicht radioaktiv-markierter RNA als Substrat)

Mit dieser Methode (modifiziert nach *Hernandez und Keller*, 1983) konnten bei Wahl eines geeigneten Primers (Oligodeoxynukleotid) reife mRNA und mRNA-Vorläufer voneinander unterschieden werden, wobei die Empfindlichkeit der Methode sehr groß ist und auch noch kleinste Mengen gespleißtes Produkt nachweisbar sind.

Es wurden meist Spleiß-Proben aus *In vitro*-Experimenten analysiert, bei denen ein "kaltes" Transkript als Substrat eingesetzt wurde; es sprach aber auch nichts dagegen, radioaktiv markierte RNA-Proben zu verwenden, da die RNA bei dieser Methode ohnehin am Schluß alkalisch hydrolysiert wird. Sie eignete sich jedoch ebenso zur Untersuchung von Gesamt-RNA oder Poly (A)⁺-RNA, die aus Hefezellen isoliert wurde (*In vivo*-Experimente). Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit des Enzyms Reverse Transkriptase, bei Vorliegen eines geeigneten einzelsträngigen DNA-Primers, der mit einem Teil der zu untersuchenden RNA basenpaart, diesen in 5'-3'-Richtung zu polymerisieren. Dies geschieht durch Verlängerung mit Deoxyribonukleotiden (dNTPs), die jeweils komplementär zur Vorlage, d.h. dem RNA-Strang sind. Ersetzt man eines der vier dNTPs durch ein entsprechendes Dideoxyribonukleotid (ddNTP), so wird die Reverse Transkriptase an der Stelle die Polymerisation beenden, an der sie erstmals dieses Nukleotid-Analog einbauen muß. Denn in ddNTPs steht die 3'-OH-Gruppe, die zur Kettenverlängerung benötigt wird, nicht zur Verfügung. Daher kommt es zum Kettenabbruch. Wählt man den Primer günstig - im Exon 2, aber nahe an der Intron-Grenze gelegen - sowie ein geeignetes ddNTP, kann man mRNA-Vorläufer und reife mRNA leicht voneinander unterscheiden, da die Kette bei beiden Molekülen an verschiedenen Stellen abbricht. Verwendet man kein ddNTP und sind genügend der vier

dNTPs vorhanden, kann der Primer bis zum 5'-Ende der RNA verlängert werden oder bis zu einer Verzweigungstelle in der RNA, wie sie z.B. in den Lassostrukturen vorkommen, die beim mRNA-Spleißen entstehen. Bei diesen Versuchen wird der Primer vorher mit gamma-³²P-ATP am 5'-Ende markiert, und die aus der Reversen Transkription resultierenden radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA-Fragmente können auf einem denaturierenden Polyacrylamid- Sequenzgel aufgetrennt werden.

Folgende Oligodeoxynukleotide fanden als Primer Anwendung:

1) ST 10: Es ist komplementär zu den ersten 20 Nukleotiden des 2. Exons der Hefe-Actin-mRNA. Unter Verwendung von ddTTP kann reifes Produkt der Spleißreaktion von Vorläufer-Molekülen unterschieden werden.

2) KK5: Es ist komplementär zu den ersten 20 Nukleotiden des 2. Exons des Mat-a1-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*. Bei Verwendung von ddGTP ist die Unterscheidung von Substrat und Produkt der Spleißreaktion möglich.

3) A2: Es wurde zur Bestimmung des Transkriptionsstarts bei den *in vivo* untersuchten Konstrukten AL 401, Al 402 und PIMYEp verwendet und hybridisiert zu 17 Nukleotiden in dem Bereich der Transkripte, der aus dem Polylinker abgelesen wird.

Unterscheidung der Vorläufer- und 2/3-Moleküle von reifen mRNAs mit der Dideoxy-ribonukleotid-Methode:

RNA aus *In vitro*-Spleißversuchen:

Ein analytischer Spleißansatz, nach Standardbedingungen durchgeführt und anschließend extrahiert und gefällt, wurde in 20 µl H₂O aufgenommen. Für diesen Versuch wurden 10µl verwendet.

RNA aus *In vivo*-Versuchen:

Es wurden 10-50 µg Gesamt-RNA oder ca. 1 µg Poly(A)⁺-RNA eingesetzt.

Die Durchführung war in beiden Fällen diesselbe. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 µl und folgende Zusammensetzung:

x µg/ml	RNA-Vorlage (siehe oben)
50 mM	Tris-HCl, pH 8,3
150 mM	KCl
0,5 mM	EDTA

1 mM	DDT
7 mM	MgCl ₂
je 15 mM	drei dNTPs (z.B.*: dCTP,dATP,dGTP)
75 mM	ddNTP (z.B.*:ddTTP)
2 Mio.cpm/ml	5'-endmarkierter (alpha ³² P) Primer (z.B.*:ST10)
400 U/ml	Reverse Transkriptase

*=bei Verwendung von Hefe-Actin-RNA als Vorlage

Zunächst wurde der ganze Reaktionsansatz ohne Zusatz von Reverser Transkriptase zusammenpipettiert und gut gemischt. Sodann inkubierte man ihn zum Denaturieren der RNA 2min bei 65°C und ließ ihn dann im Wasserbad langsam (ca. 15 min) auf 42°C abkühlen. Dabei sollte der Primer an die RNA hybridisieren. Erst dann wurde die Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Reaktion dauerte 90 min bei 42°C. Danach folgten Zugabe von 12,5 µl 0,5 M NaOH und Inkubation für 3 min bei 100°C zur alkalischen Hydrolyse der RNA, anschließend Zugabe von 12,5 µl 0,5 M HCl (Neutralisation der Lösung) und 12,5 µl 1M Tris-HCl, pH 7,4 (Abpuffern der Lösung). Das Reaktionsvolumen wurde dann mit H₂O auf 200 µl erweitert; den Abschluß bildeten zweimalige Extraktion mit "Chloropane" und Ethanol-Fällung. Die gefällten, radiomarkierten DNA-Fragmente konnten dann durch Aufnehmen in 10 µl Auftragspuffer und gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 5 % denaturierenden, analytischen Polyacrylamid-Sequenzgel (20 x 40 cm²) analysiert werden.

Bestimmung des Transkriptionsstarts:

Um den Transkriptionsstart von *in vivo* transkribierten Polymerase I-Promotor-Konstrukten (AL 401, AL 402 und PIMYE_p) bestimmen zu können, wurde mit einem geeigneten Oligodeoxynukleotid, das nicht allzu weit vom angenommenen Transkriptionsstart an die Transkripte hybridisieren konnte (A2), eine Reverse Transkription nach obiger Vorschrift durchgeführt, allerdings mit einer wichtigen Abänderung: Es wurden die vier normalen Deoxyribonukleotide eingesetzt und kein Dideoxyribonukleotid. Die so gebildeten reversen "run off"-Transkripte endeten dort, wo das 5'-Ende der RNA-Vorlage erreicht war.

4.2.16. Nachweis von Spleiß-Komplexen

Um Bindung und Prozessierung eines mRNA-Vorläufers durch Protein-Komplexe, sog. Spleißkomplexe oder "Spliceosomen", nachweisen oder aufzeigen zu können, fanden zwei Methoden Anwendung.

4.2.16.1. Glycerin-Gradienten (nach Brody und Abelson, 1985)

Lösungen: 15 %-Glycerin-Lösung und 40 % Glycerin-Lösung in folgendem

Puffer:	20 mM	Hepes-K ⁺ , pH 7,3
	100 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	0,2 mM	DTT

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Mit einer Gradienten-Mischkammer wurden offene Polyallomer- Zentrifugenröhrchen für die Beckman-Ultrazentrifuge (Inhalt 12 ml, SW41-Rotor) mit einem Glycerin-Gradienten gefüllt, der sich aus je 6 ml der beiden oben angeführten Lösungen zusammenmischte und somit im Resultat am Boden 40 % Glycerin und an der Öffnung 15 % Glycerin enthielt.

Spleiß-Reaktionen wurden nach Standard-Bedingungen, aber im dreifachen Volumen (30µl) mit ca. 50.000 bis 200.000 cpm des jeweiligen radioaktiv markierten Transkripts und für nur 15 Minuten durchgeführt und dann direkt auf je einen Gradienten geladen, der daraufhin 12 h bei 35.000 upm (4°C) zentrifugiert wurde. Danach folgte eine Fraktionierung des Gradienten, beginnend vom Boden des Zentrifugenröhrchens in 400µl Portionen, die mit zunehmender Fraktionsnummer an Dichte abnahmen. Der Dichtebereich reichte von 1,40 bis 1,36 g/ml. Die Radioaktivität (Cerenkov) pro Fraktion wurde bestimmt und in einem Diagramm zeichnerisch gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Nach "Chloropane"-Extraktion und Fällung konnten die Fraktionen auch direkt in Auftragspuffer aufgenommen und zur Auftrennung ihrer RNA-Komponenten auf ein 8%iges, denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden (siehe Kapitel "Spleiß-Nachweismethoden").

4.2.16.2. Native Gele ("Composite Gels")

Gellösung:	3 %	Acrylamid:Bisacrylamid (160:1)
	0,5 %	Agarose
in	0,5 x TBE	
Starter:	0,05 %	Ammoniumperoxodisulfat
	0,1 %	TEMED
Laufpuffer:	0,5 x TBE	
Auftragspuffer:	50 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
	0,1 %	Xylencyanol
in	2,5 x TBE	

Nach Austesten mehrere Gelsysteme fiel die Wahl auf ein Mischgel aus Polyacrylamid und Agarose obiger Zusammensetzung. 1% Agarose in 1 x TBE wurde aufgekocht und dann auf 50°C gebracht, sodann mit einer ebenfalls 50°C heißen 6% Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (160:1) gut gemischt. Nach Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 0,5 % (v/v) einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zum Starten der Polymerisation wurden die noch heißen Lösungen sehr schnell zwischen zwei Glasplatten (20 cm x 25 cm, Abstand 1,5 mm) gegossen und ein vorher silikonisierter Kamm (wichtig!) für die Auftragsaschen nur wenig hineingeschoben. Das Herausziehen des Kamms nach ca. 2 h - das Gel war danach bei Raumtemperatur auspolymerisiert - erfolgte unter größter Vorsicht und nur unter gleichzeitiger Zugabe von Laufpuffer. Das Gel konnte sich hierbei leicht verziehen - es war ziemlich spröde - und die Taschen konnten reißen. Schließlich wurden die Glasplatten unten mit einer Mullbinde umwickelt, um das Gel am Herausrutschen zu hindern, da die Elektrophorese vertikal durchgeführt wurde.

Standard Speiß-Reaktionen wurden durchgeführt, wobei die Zeiten variiert wurden (meist 0, 1, 5, 10 und 20 min und eine Kontrolle mit 20 mM EDTA im Speiß-Puffer ebenfalls für 20 min). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 µl Heparin (50 mg/ml) gestoppt, mit 3 µl Auftragspuffer gemischt und auf Eis gestellt. Sie konnten direkt auf das native Gel aufgetragen werden, nachdem dieses einer Vorelektrophorese von 1 h bei 150 V und 4°C unterworfen worden war. Die Elektrophorese selbst dauerte bei 100 V und 4°C ca. 16 h. Der Xylen-Cyanol-Farbmärker sollte dabei ungefähr eine Strecke von 15 bis 20 cm zurückgelegt haben. Nach der Elektrophorese musste das Gel nicht getrocknet werden, sondern konnte direkt bei -70°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie mit einem Röntgenfilm exponiert werden. Das Gel riß trotz der niedrigen Temperatur nicht.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Spleißmechanismus von mRNA-Vorläufer-Molekülen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

1) Ein zellfreies *In vitro*-Hefe-Spleißsystem wurde etabliert und charakterisiert: Dazu wurde ein spleißaktiver Hefe-Gesamtzell-Extrakt präpariert, in dem *in vitro* transkribierte Prä-mRNAs gespleißt werden konnten.

2) Mit diesem *In vitro*-Spleißsystem wurde die Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Länge der Exons einer Prä-mRNA von Hefe-Actin untersucht. Die Exon-Verkürzungen wurden durch RNaseH-Verdau am fertigen Transkript (beide Exons), durch gezielte Mutagenese am Transkriptionsvektor (Exon 1) oder durch Linearisieren des Vektors an verschiedenen Restriktionsschnittstellen (Exon 2) bewirkt.

Während 12 Nukleotide von Exon 1 dafür ausreichend sind, daß beide Reaktionsschritte der Spleißreaktion durchlaufen werden, findet bei einer Länge des ersten Exons von 5, 3, 2 oder 1 Nukleotiden nur noch der erste Reaktionsschritt statt, nämlich der Schnitt zwischen Exon 1 und Intron. Erst wenn alle Nukleotide des ersten Exons deletiert sind, kann keine Spleißreaktion mehr stattfinden. Beim zweiten Exon genügt eine Länge von 8 Nukleotiden, um noch beide Reaktionsschritte zu ermöglichen. In allen untersuchten Fällen konnte Spleißkomplex-Ausbildung beobachtet werden, unabhängig davon, ob die Spleißreaktion in beiden Schritten normal ablaufen kann oder nicht.

3) Ebenfalls *in vitro* wurde die Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Struktur des 5'-Endes einer Actin-Vorläufer-mRNA analysiert: Für die Spleißeffizienz spielt es keine Rolle, ob eine Prä-mRNA eine cap-Struktur (m^7GpppG), eine Triphosphat-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe oder nur eine Hydroxyl-Gruppe am 5'-Ende trägt. Auch kann die Spleißaktivität des Hefe-Extrakts durch Zugabe von 10 μM cap-Analog vor der Inkubation des Primärtranskripts (Präinkubation des Extrakts) oder während der Reaktion selbst nicht inhibiert werden.

4) Durch *In vivo*-Experimente schließlich wurden eventuelle Zusammenhänge zwischen Transkription durch RNA-Polymerase II und den RNA-Prozessierungsschritten Spleißen und Polyadenylierung untersucht: Dabei wurden proteinkodierende Hefe-Gene - Actin und MATa1 - mit dem ribosomalen Promotor kombiniert. Dabei zeigte sich, daß Transkripte, die von diesem Promotor, beginnend mit dem gleichen Startnukleotid wie die ribosomale

Vorläufer-RNA, von der RNA-Polymerase I abgelesen wurden, polyadenyliert waren und gespleißt wurden. Beide mRNA-Prozessierungsschritte sind in Hefe also nicht mit der Transkription durch RNA-Polymerase II gekoppelt. Zusätzlich konnten durch diese Experimente die Ergebnisse von 3) *in vivo* bestätigt werden, da RNA-Polymerase I-Transkripte kein cap am 5'-Ende tragen.

6. Literatur

- Aebi, M., Hornig, H., Padgett, R.A., Reiser, J. und Weissmann, C. (1986): Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. *Cell* 47, 555-565
- Astell, C.R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, B. und Hall, B.D. (1981): The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 27, 15 - 23
- Aviv, H. und Leder, P. (1972): Purification of biological active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 69, 1409 - 1412
- Baltimore, D. (1970): Viral RNA-dependent DNA-Polymerase. *Nature* 226, 1209 - 1211
- Bayev, A.A., Georgiev, O.I., Hadjiolov, A.A., Kermekchiev, M.B., Nikolaev, N., Skryabin, K.G. und Zakharyev, V.M. (1980): The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 2. The nucleotide sequence of the initiation site for ribosomal RNA transcription. *Nucleic Acids Research* 8, 4919 - 4926
- Beaucage, S.L. und Caruthers, M.H. (1981): Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* 22, 1859 - 1862
- Berget, S.M., Moore, C. und Sharp, P.A. (1977): Spliced segments at the 5'-terminus of Adenovirus 2 Late mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 3171 - 3175
- Bindereif, A. und Green, M.R. (1987): An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. *EMBO J.* 6, 2415 - 2424
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513 - 1523
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.L., Heyneker, H.L. und Boyer, H.W. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95 - 113
- Brack, C. und Tonegawa, S. (1977): Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse Myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 5652 - 5656

- Breathnach, R., Mandel, J.L. und Chambon, P. (1977): Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* 270, 314 - 319
- Brody, E. und Abelson, J. (1985): The "spliceosome": Yeast pre-messenger RNA associates with a 40 S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228, 963 - 967
- Butler, E.T. und Chamberlin, M.J. (1982): Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 257, 5772 - 5778
- Cech, T.R. (1983): RNA splicing: Three themes with variations. *Cell* 34, 713 - 716
- Chamberlin, M. und Ryan, T. (1982): Bacteriophage DNA-dependent RNA Polymerases. *The Enzymes* XV, 87 - 108
- Cheng, S.-C. und Abelson, J. (1986): Fractionation and characterization of a yeast mRNA splicing extract. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 2381 - 2387
- Choi, Y.D., Grabowski, P.J., Sharp, P.A. und Dreyfuss, G. (1986): Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: Role in RNA splicing. *Science* 231, 1534 - 1539
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. und Roberts, R.J. (1977): An amazing sequence arrangement at the 5' ends of Adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1 - 8
- Crick, F.H.L. (1958): On protein synthesis. *Symp.Soc.Exp.Biol.* 12, 548 - 555
- Darnell, J.E. (1976): mRNA structure and function. *Sci.Amer.* 242, 89 - 99
- Darnell jr., J.E. (1982): Variety in the level of gene control in eukaryotic cells (Review). *Nature* 297, 365 - 371
- Domdey, H., Apostol, B., Lin, R.J., Newman, A., Brody, E. und Abelson, J. (1984): Lariat structures are *in vivo* intermediates in yeast pre-mRNA splicing. *Cell* 39, 611 - 621
- Ederly, J. und Sonenberg, N. (1985): Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 7590 - 7594
- Elion, E.A. und Warner, J.R. (1984): The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream. *Cell* 39, 663 - 673
- Elion, A.E. und Warner, J.R. (1986): An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* 6, 2089 - 2097
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 137, 266 - 267 (Appendum zu Vol. 132 (1983), 6 - 13)
- Filipowicz, W. (1978): Functions of the 5'-terminal m⁷G cap in eukaryotic mRNA. *FEBS Lett.* 96, 1 - 11

- Furdon, P.J. und Kole, R. (1986): Inhibition of splicing but not of cleavage at the 5' splice site by truncating human beta-globin pre-mRNA. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 83, 927 - 931
- Furuichi, Y. (1978): The "transcriptional capping" in the biosynthesis of cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 1086 - 1090
- Furuichi, Y., Morgan, M., Muthukrishnan, S. und Shatkin, A.J. (1975): Reovirus messenger RNA contains a methylated blocked 5' termini structure: m⁷G(5')ppp(5')Gm-pCp. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 72, 362 - 365
- Gallwitz, D., Halfter, H. und Mertens, P. (1987): Splicing of mRNA precursors in yeast (Review). In Gene Structure in Eukaryotic Microbes, ed. J.R. Kinghorn, IRL Press, Oxford
- Gallwitz, D. und Sures, J. (1980): Structure of a split gene: Complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 2546 - 2550
- Goldenberg, C.J. und Hauser, S.D. (1983): Accurate and efficient *in vitro* splicing of purified precursor RNAs specified by early region 2 of the Adenovirus 2 genome. *Nucleic Acids Research* 11, 1337 - 1348
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R. und Sharp, P.A. (1985): A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42, 345 - 353
- Grabowski, P.J. und Sharp, P.A. (1986): Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5 and U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. *Science* 233, 1294 - 1299
- Green, M.R., Maniatis, T. und Melton, D.A. (1983): Human beta-globin pre-mRNA synthesized *in vitro* is accurately spliced in *Xenopus* nuclei. *Cell* 32, 681 - 694
- Grummt, J. und Skinner, J.A. (1985): Efficient transcription of a protein-coding gene from the RNA polymerase I promoter in transfected cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 722 - 726
- Grunstein, M. und Hogness, D.S. (1975): Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 72, 3961 - 3965
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166, 557 - 580
- Hardy, S.F., Grabowski, P.J., Padgett, R.A. und Sharp, P.A. (1984): Cofactor requirement for splicing of purified messenger RNA precursors. *Nature* 308, 375 - 377

- Heidecker, G., Messing, J. und Gronenborn, B. (1980): A versatile primer for DNA sequencing in the M13mp2 cloning system. *Gene* **10**, 69 - 73
- Hernandez, N. und Keller, W. (1983): Splicing of *in vitro* synthesized mRNA precursors in HeLa cell extracts. *Cell* **35**, 89 - 99
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. und Tzagoloff, A. (1986): Yeast/E.coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163 - 167
- Ingram, V.M. (1957): Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* **180**, 326 - 328
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., und Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bact.* **153**, 163 - 168
- Jeffreys, A.J. und Flavell, R.A. (1977): The rabbit beta-globin gene contains a large insert in the coding sequence. *Cell* **12**, 1097 - 1108
- Jove, R. und Manley, J.L. (1982): Transcription initiation by RNA polymerase II is inhibited by S-adenosylhomocysteine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**, 5842 - 5846
- Kempers-Veenstra, A.E., van Heerikhuizen, H., Musters, W., Klootwijk, J. und Planta, R.J. (1984): Transcription of an artificial ribosomal RNA gene in yeast. *EMBO J.* **3**, 1377 - 1382
- Keohavong, P., Gattoni, R., Le Moullea, J.M., Jacob, M. und Stevenin, J. (1982): The orderly splicing of the first three leaders of the adenovirus 2 major late transcript. *Nucleic Acids Research* **10**, 1215 - 1229
- Khorana, H.G. (1968): Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. In Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963 - 1970), S. 341 - 369, American Elsevier (1973)
- Klemen, R. und Geiduschek, E.P. (1980): The 5' terminus of the precursor ribosomal RNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **8**, 2679 - 2688
- Klootwijk, J., de Jonge, P. und Planta, R.J. (1979): The primary transcript of the ribosomal repeating unit in yeast. *Nucleic Acids Research* **6**, 27 - 39
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. und Sharp, P.A. (1984): Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors. *Cell* **38**, 731 - 736
- Kozak, M. (1978): How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**, 1109 - 1123
- Krainer, A.R.T., Maniatis, T., Ruskin, B. und Green, M.R. (1984): Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell* **36**, 993 - 1005

- Kretzner, L., Rymond, B.C. und Rosbash, M. (1987): *S. cerevisiae* U1 RNA is large and has limited primary sequence homology to metazoan U1 snRNA. *Cell* 50, 593 - 602
- Lai, E.C., Woo, S.L., Dugaiczky, A., Catterall, J.F. und O'Malley, B.W. (1978): The ovalbumin gene: Structural sequences in native chicken DNA are not contiguous. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 2205 - 2209
- Langford, C.J. und Gallwitz, D. (1983): Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. *Cell* 33, 519 - 527
- Langford, C., Nellen, W., Niessing, J. und Gallwitz, D. (1983): Yeast is unable to excise foreign intervening sequences from hybrid gene transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 1496 - 1500
- Langley, K.E., Villarejo, M.R., Fowler, A. V., Zamenhof, P.J. und Zabin, J. (1975): Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 72, 1254 - 1257
- Lamond, A.J., Konarska, M.M. und Sharp, P.A. (1987): A mutational analysis of spliceosome assembly: Evidence for splice site collaboration during spliceosome formation. *Genes and Development* 1, 532 - 543
- Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. und Steitz, J.A. (1980): Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283, 220 - 224
- Lewis, E.D. und Manley, J.L. (1986): Polyadenylation of an mRNA precursor occurs independently of transcription by RNA polymerase II *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83, 8555 - 8559
- Lin, R.-J., Newman, A.J., Cheng, S.-C. und Abelson, J. (1985): Yeast mRNA splicing *in vitro*. *J.Biol.Chem.* 260, 14780 - 14792
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W. und SollnerWebb, B. (1986): RNA polymerase specificity of mRNA production and enhancer action. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 6677 - 6681
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biological active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Research* 12, 7035 - 7056

- Messing, J. (1979): A multi-purpose cloning system based on the single-stranded DNA bacteriophage M13 Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publication No. 79 - 99, Vol. 2, 43 - 48
- Messing, J. (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101, 20- 79
- Mount, S.M. (1982): A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research* 10, 449 - 472
- Newman, A.J., Ogden, R.C. und Abelson, J. (1983): tRNA gene transcription in yeast: Effects of specified base substitutions in the intragenic promoter. *Cell* 35, 117 - 125
- Ng, R. und Abelson, J. (1980): Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 3912 - 3916
- Nikolaev, N., Georgiev, O.J., Venkov, P.V. und Hadjiolov, A.A. (1979): The 37 S precursor to ribosomal RNA is the primary transcript of ribosomal RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Mol.Biol.* 127, 297 - 308
- Nirenberg, M. (1968): The genetic code. In Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963 - 1970), S. 372 - 395. American Elsevier, 1973.
- Noble, J.C.S., Prives, C. und Manley, J.L. (1986): "n vitro splicing of simian virus 40 early pre-mRNA. *Nucleic Acids Research* 14, 1219 - 1235
- Padgett, R.A., Hardy, S.F. und Sharp, P.A. (1983a): Splicing of adenovirus RNA in a cell-free transcription system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 5230-5234
- Parent, A., Zeitlin, S. und Efstratiadis, A. (1987): Minimal exon sequence requirements for efficient *in vitro* splicing of mono-intronic nuclear pre-mRNA. *J.Biol.Chem.* 262, 11284 - 11291
- Patzelt, E., Thalmann, E., Hartmuth, K., Blaas, D. und Kuechler, E. (1987): Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap-dependent. *Nucleic Acids Research* 15, 1387 - 1399
- Peebles, C.L., Gegenheimer, P. und Abelson, J. (1983): Precise excision of IVS from precursor tRNAs by a membran-associated yeast endonuclease. *Cell* 32, 525 - 536
- Pikielny, C.W. und Rosbash, M. (1986): Specific small nuclear RNAs are associated with yeast spliceosomes. *Cell* 45, 869 - 877
- Pikielny, C.W., Rymond, B.C. und Rosbash, M. (1986): Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes, *Nature* 324, 341 - 345

- Puskas, R.S., Manley, N.R., Wallace, D.M. und Berger, S.L. (1982): Effects of ribonucleoside-vadadyl complexes on enzyme catalized reactions central to recombinant DNA technology. *Biochemistry* 21, 4602 - 4608
- Quincey, R.V. und Arnold, R.E. (1984): Transcription of a yeast ribosomal minigene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.* 224, 497 - 503
- Reuter, R., Appel, B., Bringmann, P., Rinke, J. und Lührmann, R., (1984): 5'-terminal caps of snRNAs are reactive with antibodies specific for 2,2,7-trimethylguanosine in whole cells and nuclear matrices. *Exp.Cell Res.* 154, 548 - 560
- Riedel, N., Wise, J.A., Swerdlow, H., Mak, A. und Guthrie, C. (1986): Small nuclear RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*: Unexpected diversity in abundance, size and molecular complexity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 8086 - 8101
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol.Biol.* 113, 237 - 251
- Roberts, R.J. (1982): Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Research* 10, r117 - 144
- Roop, D.R., Nordstrom, J.L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. (1978): Transcription of structural and intervening sequences in the ovalbumin gene and identification of potential ovalbumin mRNA precursors. *Cell* 15, 671 - 685
- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T. und Green, M.R. (1984): Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38, 317 - 331
- Rymond, B.C. und Rosbash, M. (1985): Cleavage of 5' splice site and lariat formation are independent of 3' splice site in yeast mRNA splicing. *Nature* 317, 735 - 737
- Sanger, F., Micklen, S. und Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 5463 - 5467
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. und Sharp, P.A. (1986): Splicing of messenger RNA precursors (Review). *Ann.Rev.Biochem.* 55, 1119 - 1150
- Schatz, P.J., Pillus, L., Gisafi, P., Solomon, F. und Botstein, D. (1986): Two functional alpha-tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins. *Mol.Cell.Biol.* 6, 3711 - 3721

- Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1983): Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Siliciano, P.G., Jones, M.H. und Guthrie, C. (1987): *Saccharomyces cerevisiae* has a U1-like small nuclear RNA with unexpected properties. *Science* 237, 1484 - 1487
- Sisodia, S.S., Sollner-Webb, B. und Cleveland, D.W. (1987): Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol.Cell.Biol.* 7, 3602 - 3612
- Smale, S.T. und Tijan, R. (1985): Transcription of Herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters. *Mol.Cell.Biol.* 5, 352 - 362
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98, 503 - 517
- Swanson, M.E. und Holland, M.J. (1983): RNA-polymerase I-dependent selective transcription of yeast ribosomal DNA. *J.Biol.Chem.* 258, 3242 - 3250
- Swanson, M.E., Yip, M. und Holland, M.J. (1985): Characterization of an RNA polymerase I-dependent promoter within the spacer region of yeast ribosomal cistrons. *J.Biol.Chem.* 260, 9905 - 9915
- Tessin, H.M. und Mizutani, S. (1970): Viral RNA-dependent DNA-polymerase. *Nature* 226, 1211 - 1213
- Thomas, P.S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 5201 - 5205
- Thompson-Jaeger, S. und Domdey, H. (1987): Yeast pre-mRNA splicing requires a minimum distance between the 5'-splice site and the internal branch acceptor site. *Mol.Cell.Biol.* 7, 4010 - 4016
- Tilghman, S.M., Curtis, P.J., Tiemeier, D.C., Leder, P. und Weissmann, C. (1978): The intervening sequence of a mouse beta-globin gene is transcribed within the 15 S beta-globin mRNA precursor. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 75, 1309 - 1313
- Veldman, G.M., Klootwijk, J., de Jonge, P., Leer, R.J. und Planta, R.J. (1980): The transcription termination site of the ribosomal RNA operon in yeast. *Nucleic Acids Research* 8, 5179 - 5192
- Warner, J.W. (1982): The yeast ribosome: Structure, function and synthesis. In The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolism and Gene Expression. Eds. Strather, Jones und Broach; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

- Watson, J.D. und Crick, F.H.C.** (1953): Molecular structure of nucleic acids: A structure for Deoxynucleic acids. *Nature* 171, 737 - 738
- Watts, F., Castle, C. und Beggs, J.** (1983): Aberrant splicing of *Drosophila* alcohol dehydrogenase transcript in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2, 2085 - 2091
- Wilimzig, M.** (1985): LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends in Genetics*, Juni 1985, 158
- Wise, J.A., Tollervey, D., Maloney, D., Swerdlow, H., Dunn, E.J. und Guthrie, C.** (1983): Yeasts contain small nuclear RNAs encoded by single copy genes. *Cell* 35, 743 - 751
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103 - 19
- Yanofsky, C., Carlton, B.C., Guest, J.R., Helinski, D.R. und Henning, U.** (1964): On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 51, 226 - 272
- Zeevi, M., Nevins, J.R. und Darnell jr., J.E.** (1981): Nuclear RNA is spliced in the absence of the poly(A) addition. *Cell* 26, 39 - 46
- Zhuang, Y. und Weiner, A.M.** (1986): A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* 46, 827 - 35

Lebenslauf

Name: Angela Löw-Stadlmüller, geb. Löw
Wohnort: Wettersteinstr. 21, 8023 Pullach im Isartal
Geburtsdatum: 4. Dezember 1956
Geburtsort: München
Eltern: Dr. Erwin Löw und Loni Löw, geb. Liedl
Familienstand: verheiratet seit 9. April 1988 mit Jörg Stadlmüller

Ausbildung:
1963 - 1967 Volksschule München-Solln
1967 - 1976 Gymnasium Pullach, Landkreis München (neusprachlicher
Zweig)
Juni 1976 Abitur
1976 - 1980 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
1978 Diplom-Vorprüfung
1980 - 1981 Auslandsstudium an der University of Oregon in Eugene,
Oregon, U.S.A. als Graduate Student am Department of
Biology
1977 - 1983 Begabtenstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.
(einschließlich Förderung des Auslandsstudiums)
1981 - 1984 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
April 1982 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Zoologie, Genetik und
Biochemie
Mai 1982 bis
Dezember 1983 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. B. Linzen am
Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität
München. Thema: Untersuchungen zur cuticulären und
pulmonären Transpiration von *Eurypelma californicum*.
Februar 1984 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin
Juni 1984 bis
Januar 1988 Doktorarbeit am Laboratorium für molekulare Biologie -
Genzentrum der Universität München - unter Anleitung von
Herrn Dr. H. Domdey. Thema: Untersuchungen zum
Spleißmechanismus von mRNA Vorläufern in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae: Einfluß der Exonsequenzen und
Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Transkription.

